

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica



TESIS DOCTORAL

**Biorreducción del hierro: desarrollo de alternativas
medioambientalmente limpias para la obtención del metal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Castro Ruiz

Directores

María Luisa Blázquez Izquierdo
Antonio Ballester Pérez

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS MATERIALES E

INGENIERÍA METALÚRGICA



TESIS DOCTORAL

**BIORREDUCCIÓN DEL HIERRO. DESARROLLO
DE ALTERNATIVAS MEDIOAMBIENTALMENTE
LIMPIAS PARA LA OBTENCIÓN DEL METAL**

Laura Castro Ruiz

DIRECTORES

Dra. María Luisa Blázquez Izquierdo

Dr. Antonio Ballester Pérez

Dedicada a :

Mis padres y Javier

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Antonio Ballester Pérez por haberme recibido en su grupo de investigación desde 2006. También a la Dr. María Luisa Blázquez por introducirme en el mundo de la investigación y su inestimable ayuda durante estos años. A ambos profesores agradezco su disposición para revisar y corregir el presente documento.

Muchas gracias a las doctoras Felisa González y Camino García-Balboa por la inestimable ayuda brindada en el laboratorio del Departamento de Metalurgia Extractiva

Quisiera mostrar mi especial agradecimiento al profesor Jesús A. Muñoz, por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia que hizo que nuestras conversaciones redundaran benéficamente tanto a nivel científico como personal.

Doy las gracias a todos los profesores y miembros del Departamento de Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica. A los técnicos cuya ayuda ha permitido el desarrollo de este trabajo: Juan Luis Bardonado, Ana Vicente y Ana Soubie (CNME), José E. Fernández (C.A.I. Espectroscopía), Jordi Díaz (CCiTUB) y Julián Velázquez (C.A.I. Difracción de rayos X).

Agradezco al Dr. Prof. Sand su acogida en su grupo del Biofilm Centre de la Universidad de Duisburg-Essen y su apoyo a la investigación. Al Dr. Mario Vera por su colaboración y asesoría en biología molecular y por su amistad. A Agata Wikiel, Mauricio Aguirre y Sören Bellenberg por su ayuda y los buenos momentos en Essen. Particularmente quiero darle las gracias a Ruiyong Zhang, mi dragón, por su inestimable amistad e importante colaboración experimental.

A mis padres, por todo su cariño, sus cuidados y sus esfuerzos que me han permitido llegar hasta aquí.

A Javier, el mejor descubrimiento de este tiempo, por su apoyo incondicional, sus buenos consejos y su amor.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que he conocido a durante este tiempo me han ayudado y animado. Aunque no puedo mencionar a todos, no puedo dejar de nombrar a Nathamar Dudamell, Marta Mohedano, Jennifer Pingarrón, Mayri Díaz, Mariana Vicente, Daniela Horta, Amanda Alonso, Andrew Agüero y Mauricio Tapia.

*La ciencia será siempre una búsqueda,
jamás un descubrimiento real.
Es un viaje, nunca una llegada.*

Karl Popper

INDICE

RESUMEN	7
SUMMARY	11
LISTA DE TABLAS	15
LISTA DE FIGURAS	16
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. Planteamiento del problema	25
1.1.1. Situación actual de la industria siderúrgica y de la minería del hierro	25
1.1.2. El problema de las emisiones de CO ₂ en la industria del acero	27
1.1.3. La biolixiviación como alternativa	29
1.2. Ciclo geomicrobiológico del hierro. Aspectos generales	31
1.3. Bacterias reductoras de hierro	33
1.3.1. Microorganismos fermentativos	36
1.3.2. Microorganismos sulfatorreductores	37
1.3.3. Microorganismos que conservan la energía de la reducción de Fe(III)	38
1.3.3.1. <i>Shewanella putrefaciens</i>	42
1.3.3.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	43
1.4. Mecanismos microbianos de reducción de Fe(III) a pH neutro	45
1.4.1. Biopelículas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS)	48

1.4.2.	Comunicación entre bacterias: <i>quorum sensing</i>	51
2.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	55
2.1.	Objetivos	57
2.2.	Plan de trabajo	59
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1.	Muestreo de campo	65
3.2.	Caracterización del consorcio bacteriano	67
3.3.	Aislamiento e identificación de bacterias reductoras de hierro	67
3.4.	Crecimiento de cultivos bacterianos	68
3.5.	Fuentes de ion férrico	69
3.5.1.	Citrato férrico como fuente de hierro soluble	69
3.5.2.	Síntesis de jarositas de amonio y potasio	70
3.5.3.	Síntesis de argentojarosita	71
3.5.4.	Gossan procedente de Río Tinto: un mineral natural	71
3.6.	Extracción de EPS con EDTA	72
3.7.	Caracterización química de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS)	74
3.7.1.	Análisis de carbohidratos	74
3.7.2.	Análisis de proteínas	74
3.7.3.	Análisis de ácidos urónicos	74
3.7.4.	Análisis de ácidos nucleicos	75
3.7.5.	Análisis de la lisis celular	75

3.8.	Obtención de proteínas extracelulares	76
3.8.1.	Precipitación de proteínas	76
3.8.2.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	76
3.8.3.	Tinción de los geles de poliacrilamida	77
3.9.	Detección y caracterización de las <i>N</i>-acil-homoserina lactonas (AHLs)	77
3.10.	Otras técnicas analíticas	78
3.10.1.	Determinación de Fe(II) y Fe total	78
3.10.2.	Cromatografía iónica (IC)	78
3.10.3.	Difracción de rayos X	79
3.10.4.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	80
3.10.5.	Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)	80
3.10.6.	Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	81
3.10.7.	Microscopia de fuerza atómica (AFM)	81
3.10.8.	Microscopía confocal láser de barrido (CLSM)	82
3.10.8.1.	Tinción de ácidos nucleicos	82
3.10.8.2.	Visualización de polisacáridos: ensayos con lectinas	82
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
PARTE 1.	Aislamiento y caracterización de microorganismos reductores de Fe(III)	87
4.1.1.	El consorcio microbiano natural	87
4.1.2.	El aislado <i>Aeromonas hydrophila</i>	94
4.1.3.	Un cultivo de colección: <i>Shewanella putrefaciens</i>	97

4.1.4.	Comparación de la biorreducción de citrato férrico con los diferentes cultivos_	100
--------	---	-----

4.1.5.	Adaptación de los cultivos a valores de pH moderadamente ácidos	102
--------	---	-----

	Conclusiones de la Parte 1. Part 1 Conclusions	105
--	--	-----

PARTE 2. Biolixiviación reductora de sólidos férricos: jarositas sintéticas y naturales __ 108

4.2.1.	Biolixiviación reductora de jarositas de amonio y potasio	111
--------	---	-----

a)	Biolixiviación con el consorcio natural	112
----	---	-----

b)	Biolixiviación con <i>Shewanella putrefaciens</i>	118
----	---	-----

c)	Biolixiviación con <i>Aeromonas hydrophila</i>	121
----	--	-----

d)	Comparación de los resultados de biolixiviación reductora de jarositas de amonio y potasio con los distintos cultivos de bacterias hierro-reductoras	125
----	--	-----

4.2.2.	Biolixiviación reductora de argentojarosita	129
--------	---	-----

a)	Biolixiviación con el consorcio natural	130
----	---	-----

b)	Biolixiviación con <i>Shewanella putrefaciens</i>	134
----	---	-----

c)	Biolixiviación con <i>Aeromonas hydrophila</i>	139
----	--	-----

d)	Comparación de los resultados de biolixiviación reductora de argentojarosita con los distintos cultivos de bacterias hierro-reductoras	142
----	--	-----

4.2.3.	Biolixiviación reductora de mineral de gossan de Río Tinto	145
--------	--	-----

a)	Biolixiviación con el consorcio natural	146
----	---	-----

b)	Biolixiviación con <i>Shewanella putrefaciens</i>	150
----	---	-----

c)	Biolixiviación con <i>Aeromonas hydrophila</i>	153
----	--	-----

d) Comparación de los resultados de biolixiviación reductora del mineral de gossan con los distintos cultivos de bacterias hierro-reductoras _____	157
--	-----

Conclusiones de la Parte 2. Part 2 Conclusions _____	159
--	-----

PARTE 3. Mecanismo de reducción de Fe(III) en minerales férricos: estudios de la interacción bacteria-mineral _____ 163

4.3.1. Influencia de las sustancias húmicas en la biolixiviación reductora del Fe(III) de jarositas	164
---	-----

a) Influencia del AQDS en la biorreducción del Fe(III) con el consorcio natural ____	165
b) Influencia del AQDS en la biorreducción del Fe(III) con <i>Shewanella putrefaciens</i> _____	168
c) Influencia del AQDS en la biorreducción de Fe(III) con <i>Aeromonas hydrophila</i>	170
d) Comparación de los resultados de biorreducción de Fe(III) en presencia de AQDS con los distintos cultivos _____	172

4.3.2. Influencia de los agentes quelantes en la biorreducción de jarosita _____	173
--	-----

a) Influencia de los compuestos quelantes en la biorreducción de jarosita con <i>Shewanella putrefaciens</i> _____	175
b) Influencia de los compuestos quelantes en la biorreducción de jarosita con el aislado <i>Aeromonas hydrophila</i> _____	180

4.3.3. Biopelículas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS) _____	184
---	-----

a) Caracterización de la biopelícula producida por el consorcio natural _____	185
b) Caracterización de las EPS producidas por <i>Shewanella putrefaciens</i> _____	190
c) Caracterización de las EPS producidas por <i>Aeromonas hydrophila</i> _____	200
d) Nanohilos conductores en <i>Aeromonas hydrophila</i> _____	212

Conclusiones de la Parte 3. Part 3 Conclusions	227
5. CONCLUSIONES GENERALES	231
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	243
ANEXO	269

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El procesamiento de menas minerales para la obtención de metales mediante tecnologías convencionales conlleva unos gastos considerables de energía y reactivos que además son perjudiciales para el medio ambiente. Actualmente, hay un interés creciente en la investigación de tratamientos ecológicos y sostenibles, tanto por los posibles riesgos medioambientales, acrecentados por una legislación cada vez más restrictiva, como por un interés económico e industrial. En este contexto, el papel de algunos microorganismos en la disolución de minerales convierte a la biolixiviación en una alternativa para la obtención de distintos metales, puesto que los procesos biológicos suponen un gasto de energía y reactivos considerablemente menor y, en consecuencia, son más rentables y respetuosos con el medioambiente (Hallberg et al., 2011; Papassiopi et al., 2010). Los avances recientes en campos como la biología molecular, el análisis químico, la ciencia de superficies o la nanobiotecnología, han contribuido a mejorar la comprensión de este bioproceso.

La biolixiviación, tradicionalmente, se ha asociado a bacterias oxidantes del Fe(II). Sin embargo, en las últimas décadas se han descubierto microorganismos que oxidan materia orgánica acoplada a la reducción de Fe(III). Estas bacterias llevan a cabo la reducción desasimilatoria del hierro y desempeñan un papel importante en el ciclo bioquímico del hierro y en la degradación de materia orgánica en suelos y sedimentos, donde los minerales férricos participan como aceptores terminales de electrones (Lovley, 1991; Wang et al., 2009). La biolixiviación anaerobia de hierro tiene lugar de forma generalizada en el subsuelo, incluidas las zonas afectadas por la actividad minera. Además, no requiere oxígeno, se evita la utilización de ácidos y puede contribuir a reducir las emisiones de CO₂ (Li et al., 2005). Por lo tanto, la biolixiviación reductora puede ser una alternativa medioambientalmente atractiva para la extracción de hierro de minerales refractarios y para el reprocesado de materiales de desecho procedentes de las actividades mineras, como las jarositas, $\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, que pueden ser consideradas fuente para la recuperación de los metales valiosos que pueden contener (Dutrizac and Jambor, 2000).

El Fe(III) tiene una solubilidad muy baja y generalmente aparece como óxidos insolubles a pH neutro. Uno de los principales retos para la implementación en la industria de la biolixiviación anaerobia, así como un tema importante de investigación, es la adaptación de los cultivos microbianos a crecer utilizando minerales de hierro en lugar de fuentes solubles de ion férrico. Las bacterias reductoras de Fe(III) neutrófilas son capaces de llevar a cabo la disolución reductora de algunos minerales de hierro. Sin embargo, a diferencia de otros aceptores electrónicos, el ion férrico puede formar diferentes óxidos e hidróxidos con distintas estructuras cristalinas y estados de oxidación del metal. Este aspecto tiene un efecto importante en la biodisponibilidad del metal (Bonneville et al., 2009). En general, cuanto más cristalino es el óxido de Fe(III),

menos susceptible es de ser reducido por la acción microbiológica. Por ello, la biorreducción de sólidos amorfos de Fe(III) ha sido más estudiada que la de los minerales cristalinos (Lovley et al., 1998).

Los microorganismos que llevan a cabo la reducción desasimilatoria de Fe(III) transfieren los electrones procedentes del metabolismo a los lugares donde tiene lugar la reducción fuera de la membrana. Los mecanismos a través de los cuales los microorganismos acceden y reducen los compuestos insolubles de Fe(III) no se conocen con claridad (Luu and Ramsay, 2003). Al principio se consideraba que era necesario el contacto directo de la célula con el óxido para que tuviera lugar la reducción microbiana de Fe(III). Sin embargo, las investigaciones posteriores se han centrado en el papel de los citocromos c extracelulares en la transferencia de electrones (Richardson et al., 2012) y en el uso de compuestos “lanzadera de electrones” tanto sintetizados por la célula (Stintzi et al., 2000) como presentes en el medio (Castro et al., 2013). Estudios recientes han demostrado que algunos pili bacterianos son conductores eléctricos por lo que podrían intervenir en el transporte de electrones hacia los aceptores metálicos durante la respiración (Gorby et al., 2006; Reguera et al., 2005). En este sentido, la identificación de compuestos quelantes de Fe(III) y de moléculas que actúan como lanzaderas de electrones producidas por los microorganismos, así como una mejor comprensión de cómo la comunicación entre los microorganismos cambia su comportamiento e influye en la formación de biopelículas, son aspectos fundamentales para comprender la importancia biológica y ecológica de los mecanismos postulados.

En función de todo lo anterior, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral se ha concretado en el estudio de la reducción bacteriana del ion férrico y en la capacidad de los cultivos para mantener el hierro en disolución; así como en la investigación de los distintos mecanismos microbianos involucrados en la reducción del metal y en la interacción entre las superficies de los sólidos y las bacterias. Este objetivo principal se llevó a cabo mediante:

- El aislamiento de cultivos bacterianos reductores de hierro.
- El estudio de la reducción de sólidos férricos por los distintos cultivos bacterianos reductores de este metal.
- El estudio de la influencia de las sustancias húmicas y de los agentes quelantes en el proceso de biorreducción.
- La extracción y caracterización de las biopelículas formadas sobre los minerales, de las sustancias poliméricas extracelulares y de los nanohilos conductores que en algunos casos las forman.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los microorganismos utilizados se aislaron de un lago formado en la corta minera “Brunita” (fuente de minerales de Pb y Zn) en La Unión (Murcia, España). Algunos

aislados se purificaron y se enviaron a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) para su catalogación. La investigación se llevó a cabo con tres cultivos diferentes: un consorcio natural, el aislado *Aeromonas hydrophila* y una cepa de la colección alemana DSMZ de *Shewanella putrefaciens*.

Todos los experimentos de biorreducción se realizaron con el medio Postgate C modificado y se inocularon con diferentes cultivos activos de microorganismos reductores de Fe(III), utilizando citrato férrico o minerales férricos como sustrato. Se emplearon técnicas estándar de anaerobiosis, en condiciones estériles, en estático, a 30 °C y en la oscuridad.

La cinética de biorreducción desasimilatoria de Fe(III) se determinó analizando el hierro ferroso (método de la ferrozina) y el hierro total (espectroscopía de absorción atómica) y el número de células. La caracterización mineralógica de los precipitados y de los residuos de biolixiviación se llevó a cabo mediante difracción de rayos X (XRD), SEM y EDS.

Las biopelículas y las sustancias poliméricas extracelulares producidas en la interacción célula-mineral se estudiaron mediante diferentes técnicas: análisis químico, espectroscopia infrarroja (FTIR), estudios de proteómica, microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía láser confocal (CLSM). Los nanohilos bacterianos se caracterizaron, fundamentalmente, mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y mediante técnicas de purificación e identificación de proteínas.

3. RESULTADOS

Se exploró la biolixiviación anaerobia como alternativa medioambientalmente limpia para la obtención de hierro. Con este objetivo, se trabajó con un consorcio microbiano natural procedente de la zona minera anteriormente citada y se aislaron varios microorganismos heterótrofos con capacidad reductora de hierro. Se comprobó la eficiencia de estos aislados mediante ensayos de reducción de Fe(III) soluble. De las cepas aisladas, se escogió la bacteria *Aeromonas hydrophila* A para ensayar la biolixiviación de minerales de la familia de las jarositas. También se hicieron ensayos de biorreducción de minerales férricos con un consorcio natural y con el cultivo de colección *Shewanella putrefaciens*, con una conocida capacidad reductora de hierro. *A. hydrophila* y *S. putrefaciens* fueron capaces de reducir y solubilizar el hierro procedente de las jarositas. La composición de éstas fue clave en la biorreducción ya que la presencia de metales tóxicos, como la plata, dificultó el crecimiento de los cultivos. Un aspecto destacable fue la formación de nanopartículas de plata durante la biorreducción de argentojarosita con *S. putrefaciens*. Por otro lado, el consorcio natural fue capaz de reducir con éxito el ion férrico de los distintos minerales inmovilizando los metales como sulfuros debido a la presencia de bacterias sulfatorreductoras en el cultivo. Por tanto, el consorcio natural podría ser utilizado en la biorremediación de suelos contaminados.

Se estudió la influencia de la adición de sustancias húmicas y quelantes de hierro en el proceso de biorreducción. Las sustancias húmicas pueden actuar como lanzadera de electrones entre la célula y el mineral. La reducción de jarosita por la bacteria *S. putrefaciens* en presencia de AQDS, análogo sintético de las sustancias húmicas, es más rápida que sin AQDS reduciéndose a la mitad el tiempo necesario para alcanzar el máximo de reducción. Los quelantes disminuyeron la necesidad de las células de establecer un contacto directo con los sólidos férricos aumentando la velocidad de reducción y manteniendo el ion ferroso en disolución (en un porcentaje superior al 80% del Fe suministrado), lo que los convierte en agentes clave para la implementación de estas bacterias en biolixiviación.

Finalmente, se estudió la importancia de las biopelículas y de las sustancias poliméricas extracelulares en la interacción célula-mineral. El análisis conjunto de la información permitió conocer que tanto los polisacáridos como las proteínas tienen un papel fundamental en la adhesión celular y en la estabilización de las biopelículas; las proteínas son, probablemente, responsables de la transferencia electrónica.

Además, se evidenció que *A. hydrophila* produce nanohilos conductores para llevar a cabo la transferencia electrónica entre los minerales y las células. Se estudiaron algunos factores que influyeron en su formación, como la naturaleza de los soportes y el sistema regulador de *quorum sensing*. Los soportes con carga superficial positiva y más conductores favorecen la adhesión celular y la formación de los nanohilos. Además, la expresión de los nanohilos se puede controlar mediante la adición de acil-homoserin lactonas.

4. CONCLUSIONES

La biorreducción de Fe(III) estudiada presenta potenciales aplicaciones en diferentes campos de la biotecnología.

Biolixiviación. La capacidad de las cepas de *S. putrefaciens* y *A. hydrophila* para disolver los minerales de hierro permite su aplicación en biohidrometalurgia para extraer metales de los minerales.

Biorremediación. El consorcio microbiano natural, que contiene bacterias sulfato-reductoras, podría utilizarse para este propósito mediante la precipitación de metales tóxicos formando sulfuros biogénicos como un proceso de biorremediación. La utilización de microorganismos procedentes de un ambiente minero redundaría en una adaptación al medio más fácil y en un posible menor impacto en el ecosistema que rodea la zona.

Pilas de combustible. *A. hydrophila* creció sobre superficies de grafito formando “nanohilos” conductores entre las células y la superficie que podrían permitir la transferencia de los electrones generados en la respiración microbiana a electrodos de grafito para producir electricidad.

SUMMARY

1. INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Mineral ore processing in the recovery of metals by conventional technologies involve high energy and reagents costs and environmental risks. Nowadays, there is a growing interest in the development of environmentally friendly sustainable treatments. In this context, the role of some microorganisms in mineral dissolution makes bioleaching an alternative method to obtain different metals. Biological options involve considerably less energy or reagent expenditure and consequently are more cost-effective and environmentally friendly (Hallberg et al., 2011; Papassiopi et al., 2010). Recent advances in fields, such as molecular biology, chemical analysis, surface science or nanobiotechnology, have contributed to improve the understanding of this bioprocess.

Traditionally, bioleaching has been related to Fe(II)-oxidizing bacteria. Nevertheless, microorganisms that oxidize organic matter coupled to the Fe(III) reduction have been found over the last decades. These dissimilatory iron reducing bacteria play an important role in the biochemical cycling of iron and organic matter degradation in soils and sediments, where Fe(III) minerals participate as terminal electron acceptors (Lovley, 1991; Wang et al., 2009). Anaerobic iron bioleaching is ubiquitous in subsurface environments, including mining-impacted areas. In addition, oxygen is not required and acid generation and CO₂ emissions are avoided in anaerobic bioleaching (Li et al., 2005). In consequence, anaerobic bioleaching may be an attractive alternative for iron extraction from recalcitrant ores and re-processing waste materials from mining operations, such as jarosites, $\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, which can be considered a valuable source to recover metals (Dutrizac and Jambor, 2000).

Fe(III) has a very low solubility and is usually present as insoluble oxides at neutral pH. One of the main challenges for the industrial implementation of anaerobic bioleaching, as well as a decisive research stage, is the adaptation of microbial cultures to grow on iron minerals instead of soluble sources of ferric iron. Neutrophilic Fe-reducing bacteria have also been shown to cause the reductive dissolution of some ferric iron minerals. One important difference between ferric iron and other electron acceptors is that it can form different oxides and hydroxides with different crystalline structures and oxidation states of the metal. This fact has an important effect on its bioavailability (Bonneville et al., 2009). In general, the more crystalline the Fe(III) oxide, the less susceptible it is to microbial reduction. Bioreduction of amorphous Fe(III) minerals has been extensively studied due to their poor crystalline structure in contrast with the few studies on crystalline compounds (Lovley et al., 1998).

Dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms transfer electrons derived from central metabolism to a site of reduction somewhere outside the membrane. The mechanisms by which microorganisms access and reduce insoluble Fe(III)-compounds are poorly understood (Luu and Ramsay, 2003). At first it was considered that microbial Fe(III)

reduction required a direct cell contact with the oxide. However, later investigations have focused on the role of outer-membrane c-type cytochromes in electron transfer to Fe(III) (Richardson et al., 2012) or on the use of “electron shuttling” compounds either produced by the cells (Stintzi et al., 2000) or present in their environment (Castro et al., 2013). Nowadays findings show that some bacterial pili are electrically conductive suggesting that these “nanowires” act as electron conduits to metal acceptors during respiration (Gorby et al., 2006; Reguera et al., 2005).

The main objective of the present PhD dissertation is centred in the study of the bacterial reduction of ferric iron and in the ability of the cultures to keep the iron in solution; as well as in the research of the diverse mechanism involved in the metal reduction and in the interaction between solid surface and the cells. This main aim was reached through:

- The isolation of Fe(III)-reducing microorganisms.
- The study of ferric minerals reduction by different bacterial cultures.
- The study of the effect of the humic substances and the chelant compounds in the bioreduction process.
- The extraction and characterization of the biofilms produced on the minerals, the extracellular polymeric substances and the nanowires.

2. MATERIALS AND METHODS

The strains for the study were isolated from the edge of an open-pit lake surrounding an abandoned mine site named “Brunita” (formerly a source of Pb–Zn ores) near La Unión (Murcia, Spain). Some isolates were purified before being sent to the Spanish Collection of Type Cultures (CECT) for identification. The research was carried out with three cultures: a natural consortium, the isolate *Aeromonas hydrophila* and a pure strain of *S. putrefaciens* from the German Collection DSMZ.

All the experiments were performed using the modified Postgate C medium supplemented with ferric citrate or with the mineral as electron acceptor, and the culture strains were inoculated starting from an active Fe(III)-reducing culture. Standard anaerobic techniques and sterilized conditions were used in this research. The cultures were incubated unstirred at 30 °C in darkness.

The kinetic studies of the dissimilatory Fe(III) bioreduction were monitored by taking samples at different times and analyzing ferrous and total iron concentration and the total number of cells. Fe²⁺ was determined by the ferrozine method. Total iron was determined in the same dilute acid solution by atomic absorption spectroscopy. The mineralogical characterization of the precipitates was carried out by powder X-ray diffraction (XRD), SEM and EDS.

The importance of bacterial biofilms and extracellular polymeric substances in the interaction cell-mineral was studied by chemical analysis, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), proteomic tools, scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The bacterial nanowires were characterized mainly by atomic force microscopy (AFM) and by the purification and identification of proteins.

3. RESULTS

The present research explores the anaerobic bioleaching of ferric substrates as an environmentally friendly alternative for the recovery of iron. To achieve this aim, a natural microbial consortium was sampled from an abandoned mine area and from that several heterotrophic Fe(III)-reducing microorganisms were isolated. The iron reducing efficiency of these isolates were tested using a soluble source of Fe(III). Among the isolates, a strain of *Aeromonas hydrophila* was then selected to perform bio-reduction experiments using jarosite minerals. Additional iron bioreduction tests were also conducted using the natural consortium and a type strain of *Shewanella putrefaciens* from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) with a well-known Fe(III)-reducing ability. *A. hydrophila* and *S. putrefaciens* were able to reduce and solubilise iron from the jarosites. The composition of the jarosites was crucial in the bioreduction process and the presence of toxic metals, such as silver, hindered bacterial growth. A remarkable fact is the formation of silver nanoparticles when *S. putrefaciens* was grown on argentojarosite. On the other hand, the natural consortium reduced successfully the different ferric minerals immobilising metals as sulphides because of the presence of sulphate-reducing bacteria in the culture. Hence the consortium could be used in the bioremediation of contaminated soils.

Furthermore, the effect of the addition humic substances and iron chelants in the bioreduction process was studied. Humic substances act as electron shuttles between bacteria and minerals. The reduction of jarosite using the *S. putrefaciens* strain in the presence of anthraquinone -2,6- disulfonate (AQDS), a synthetic analogue of humic substances, reached the maximum value faster than in the absence of it. Fe(III)-chelating compounds alleviate the need to establish cell-mineral direct contact increasing the reaction rate and maintaining ferrous ion in the aqueous phase (more than 80% of the initial source of iron). In consequence, chelants may be crucial compounds in the implementation of these strains in bioleaching.

Finally, the importance of bacterial biofilms and extracellular polymeric substances in the interaction cell-mineral was studied. The combined results showed that both extracellular proteins and polysaccharides play an important role in stabilizing biofilm structure and cell adhesion, and those proteins are likely involved in electron transfer in redox processes.

Moreover, evidence of nanowires production by *A. hydrophila* to transfer electrons between cells and minerals was found. Some factors involved in the nanowire formation, such as the nature of the substrates and the quorum sensing system, were studied. It was observed that positive charged surfaces and conductive substrates enhance the nanowires formation. In addition, the expression of the nanowires can be controlled using different acyl-homoserine lactones.

4. CONCLUSIONS

Fe(III) bio-reduction studied in the present research work points out potential applications in different fields of biotechnology.

Bioleaching. The capacity of the strains of *S. putrefaciens* and *A. hydrophila* to dissolve ferric minerals could lead to the application within biohydrometallurgy to extract metals from their ores.

Bioremediation. The natural consortium which contains sulphate-reducing that could be suitable for this purpose through the precipitation of toxic metals using biogenic sulphide. The use of microorganisms from a mine environment would end up benefiting the easier adaptation to the area and the lower impact in the surrounding area.

Fuel cells. *A. hydrophila* grew on graphite supports developing conductive “nanowires”. The flow of electrons through these wires from the bacteria to electrode could generate electricity that could be stored.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos fermentativos reductores de Fe(III).	36
Tabla 2. Microorganismos sulfatorreductores reductores de Fe(III).	38
Tabla 3. Componentes del medio Postgate C modificado.	69
Tabla 4. Componentes del medio 9K	70
Tabla 5. Análisis químico de la muestra de mineral gossan de la mina de Río Tinto.	72
Tabla 6. Lectinas conjugadas con marcadores fluorescentes utilizadas en este estudio.	83
Tabla 7. Análisis molecular (DGGE) del consorcio natural.	88
Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de reducción microbiana de citrato férrico. Cantidad de Fe(III) inicial: 60 mM.	102
Tabla 9. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de biolixiviación reductora de jarositas. Cantidad de Fe(III) inicial suministrada como jarosita de amonio y potasio ($\text{NH}_4\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, $\text{KFe}_2(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$): 60 mM, 3,35 g/l.	128
Tabla 10. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de biolixiviación reductora de argentojarosita. Cantidad inicial de Fe(III) suministrada como jarosita de plata ($\text{AgFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$): 60 mM, 3,35 g/l.	144
Tabla 11. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de biolixiviación reductora del mineral de gossan. Cantidad inicial de Fe(III) suministrada como mineral de gossan: 10 g/l.....	158
Tabla 12. Constante de estabilidad de algunos compuestos formados con iones quelantes de hierro.	174
Tabla 13. Composición química de las EPS producidas por <i>S. putrefaciens</i> crecidas bajo diferentes condiciones.....	191
Tabla 14. Composición química de las EPS producidas por <i>A. hydrophila</i> crecidas bajo diferentes condiciones.....	202
Tabla 15. Proteínas extracelulares de la fracción capsular de las EPS.	205
Tabla 16. Proteínas extracelulares de la fracción capsular de las EPS débilmente unidas a la célula.	217

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la producción mundial de mineral de hierro entre los años 2000 y 2010. Fuente: U.S. Geological Survey (2003-2010), TD Newcrest (2011(esperado)-2012(esperado)) (http://minerals.usgs.gov/).	26
Figura 2. Producción mundial de acero (Mt). Fuente: World Steel Association (http://www.worldsteel.org/).	26
Figura 3. Tendencia mundial de las emisiones de CO ₂ entre los años 1900 y 2000 (Kundak et al., 2009).	28
Figura 4. Ciclo geomicrobiológico del hierro.	32
Figura 5. Árbol filogenético de especies capaces de conservar la energía procedente de la reducción de Fe(III), basado en secuencias de genes 16S rRNA (Lovley et al., 2004).	35
Figura 6. Esquema de los principales mecanismos de transferencia electrónica extracelular utilizados por bacterias reductoras: (a) transferencia electrónica directa, (b) mediante lanzadera de electrones, y (c) mediante una matriz sólida conductora (Torres et al., 2010).	45
Figura 7. Esquema de la estructura de las EPS (Sheng et al., 2010).	49
Figura 8. Esquema del sistema de <i>quorum sensing</i> en <i>Vibrio fischeri</i> .	51
Figura 9. Estructura de la <i>N</i> -acil-homoserina lactona.	52
Figura 10. Situación geográfica del lugar de muestreo en el distrito minero de Cartagena-La Unión (Murcia). Corta Brunita.	65
Figura 11. Localización de las cinco zonas de muestreo en la corta Brunita.	67
Figura 12. Modelo de jarra anaerobia empleada para el crecimiento de los microorganismos en placa. Cultivos tras 4 días de incubación.	68
Figura 13. Síntesis de jarositas con la ayuda de un cultivo de <i>S. metallicus</i> .	71
Figura 14. Esquema general del método empleado para la extracción de las EPS.	73
Figura 15. (a) Cinética de reducción del hierro férrico con el cultivo del consorcio microbiano natural. Concentración inicial de Fe (suministrado como citrato férrico soluble): 60 mM. Los puntos son la media de la cantidad de Fe (II) reducida con barras de error estándar (n=2). Las barras de error no visibles son de tamaño inferior a los símbolos. (b) Evolución del pH y del potencial durante el proceso de biorreducción.	89
Figura 16. Evolución de los aniones citrato, lactato y acetato durante la biorreducción de Fe(III) soluble con el consorcio natural (△citrato control, ▲citrato consorcio, □lactato control, ■ lactato consorcio, ○ acetato control, ● acetato consorcio).	91

Figura 17. Difractograma de rayos X del precipitado producido por el consorcio natural. S = siderita.	92
Figura 18. Micrografías SEM del residuo obtenido en el ensayo de biorreducción de Fe(III) soluble con el consorcio natural.	93
Figura 19. (a) Cinética de reducción del hierro férrico con el cultivo de <i>A. hydrophila</i> . Concentración inicial de Fe (suministrado como citrato férrico soluble): 60 mM. (b) Evolución del pH y del potencial durante el proceso de biorreducción.	94
Figura 20. Evolución de los aniones citrato y lactato durante la biorreducción de Fe(III) soluble con <i>A. hydrophila</i> (Δ citrato control, ▲ citrato <i>A. hydrophila</i> , □ lactato control, ■ lactato <i>A. hydrophila</i>).	96
Figura 21. Micrografía SEM del aislado <i>A. hydrophila</i> en el ensayo de biorreducción de Fe(III).	96
Figura 22. (a) Cinética de reducción del hierro férrico en el cultivo de <i>S. putrefaciens</i> . Concentración inicial de Fe (suministrado como citrato férrico soluble): 60 mM. (b) Evolución del pH y del potencial durante el proceso de biorreducción.	97
Figura 23. Evolución de los aniones citrato y lactato durante la biorreducción de Fe(III) soluble con la cepa <i>S. putrefaciens</i> (Δ citrato control, ▲ citrato <i>S. putrefaciens</i> , □ lactato control, ■ lactato <i>S. putrefaciens</i>).	99
Figura 24. Micrografía SEM del aislado <i>S. putrefaciens</i> en el ensayo de biorreducción de Fe(III) soluble.	99
Figura 25. Comparación de la cinética de reducción de Fe(III) en los diferentes cultivos ensayados. Concentración inicial de Fe (suministrado como citrato férrico soluble): 60 mM	100
Figura 26. Diagrama de Pourbaix del hierro.	103
Figura 27. (a) Cinética de reducción de hierro a valores de pH iniciales de 7 y 4,5 con el consorcio microbiano. Concentración inicial de Fe: 60 mM (suministrado como citrato férrico soluble). (b) Evolución del pH durante los ensayos de biorreducción.	104
Figura 28. Caracterización de las jarositas sintetizadas por <i>Sulfolobus metallicus</i> : (a) Imagen FE-SEM de electrones secundarios y (b) difractograma de rayos X (verde: K-jarosita, y azul: NH ₄ -jarosita).	111
Figura 29. Biolixiviación de jarositas de amonio y de potasio con el consorcio natural. (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el ensayo.	113
Figura 30. Biorreducción del sulfato con lactato como fuente de carbono.	114
Figura 31. Micrografía FE-SEM del residuo de biolixiviación de las jarositas con el consorcio microbiano natural.	116
Figura 32. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y potasio con el consorcio microbiano natural. S = siderita; V = vivianita; J = jarosita.	117
Figura 33. Biolixiviación reductora de las jarositas de amonio y de potasio con <i>S. putrefaciens</i> . (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el proceso de biorreducción.	119

Figura 34. (a) y (b) Micrografías FE-SEM del residuo de biolixiviación de las jarositas con el cultivo de <i>S. putrefaciens</i> . (c) Análisis EDS de las partículas cristalinas. (d) Análisis EDS de las partículas esféricas.	120
Figura 35. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y potasio con <i>S. putrefaciens</i> . S = siderita; M = magnetita; V = vivianita.	121
Figura 36. Biolixiviación reductora de las jarositas de amonio y potasio con <i>A. hydrophila</i> (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el proceso de biorreducción.	122
Figura 37. Imagen SEM de células de <i>A. hydrophila</i> unidas a la superficie de la jarosita transformada y su biopelícula.	123
Figura 38. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y potasio con <i>A. hydrophila</i> . J = jarosita; M= magnetita; V = vivianita.	123
Figura 39. Comparación de la biolixiviación de las jarositas de amonio y de potasio en discontinuo y en semicontinuo con <i>A. hydrophila</i>	125
Figura 40. (a) Comparación de la cinética de reducción del Fe(III) y (b) de disolución del Fe(II), por lixiviación de jarositas de amonio y potasio con los diferentes cultivos.	126
Figura 41. Caracterización de la argentojarosita sintética utilizada en los ensayos de biolixiviación reductora. (a, b) Micrografías FE-SEM de electrones secundarios, (c) análisis EDX y (d) difractograma de rayos X.	129
Figura 42. Ensayos de biorreducción de jarosita de plata: control abiótico y medios inoculados con los distintos cultivos bacterianos.	130
Figura 43. Biolixiviación de argentojarosita con el consorcio natural. (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y de la población celular. (b) Variación del pH y del potencial durante el ensayo.	131
Figura 44. Micrografías FE-SEM de (a) electrones secundarios y (b) retrodispersados del residuo de argentojarosita lixiviada con el consorcio natural.	132
Figura 45. Difractograma de rayos X del residuo de la argentojarosita atacada por el consorcio natural. AJ = argentojarosita; S = siderita; V = vivianita; AS = sulfuro de plata.	133
Figura 46. Biolixiviación de argentojarosita con <i>S. putrefaciens</i> . (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el ensayo.	134
Figura 47. Micrografías FE-SEM de (a) electrones secundarios y (b) electrones retrodispersados del residuo de la argentojarosita atacada por <i>S. putrefaciens</i> . (c) Detalle de las células sobre el mineral de jarosita de plata. (d) Detalle de las nanopartículas de plata formadas en el proceso de biolixiviación reductora.	136
Figura 48. Difractograma de rayos X del residuo de la argentojarosita atacada por el cultivo de <i>S. putrefaciens</i> . V = vivianita; S = siderita; AJ = jarosita de plata; Ag = plata metálica.	138
Figura 49. Biolixiviación de argentojarosita con <i>A. hydrophila</i> . (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y de la población celular. (b) Variación del pH y del potencial durante el ensayo.	139

Figura 50. Imagen de FE-SEM de electrones secundarios del residuo de la argentojarosita atacada por <i>A. hydrophila</i> .	141
Figura 51. Difractograma de rayos X del residuo de la argentojarosita atacada por el cultivo de <i>A. hydrophila</i> . AJ = argentojarosita; V = vivianita; Ag = plata metálica; M = magnetita.	141
Figura 52. Comparación de la reducción y solubilización del hierro con los diferentes cultivos microbianos usando 60 mM de Fe suministrado como argentojarosita. Comparación de la cinética: (a) de reducción de jarosita y (b) de solubilización de Fe (II).	142
Figura 53. Caracterización del mineral gossan. (a) Micrografía FE-SEM de electrones secundarios y (b) análisis EDX del mineral gossan de Río Tinto utilizado en los ensayos de biorreducción.	145
Figura 54. Difractograma de rayos X del mineral de gossan de Río Tinto utilizado en los ensayos de biorreducción. G = goethita; J = jarosita; H = hematita.	146
Figura 55. Biolixiviación del mineral de gossan de Río Tinto con el consorcio natural. (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el ensayo.	147
Figura 56. Micrografía SEM del residuo de biolixiviación reductora del mineral de gossan con el consorcio natural.	148
Figura 57. Difractograma de rayos X del residuo del mineral gossan atacado por el consorcio microbiano natural. Ag-P = argentopirita; S = siderita; V = vivianita; G = goethita.	149
Figura 58. Biolixiviación del mineral de gossan de Río Tinto con <i>S. putrefaciens</i> . (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el ensayo.	151
Figura 59. Micrografía SEM del residuo obtenido en el ensayo de biolixiviación reductora de mineral de gossan con el cultivo de <i>S. putrefaciens</i> .	152
Figura 60. Difractograma de rayos X del residuo del mineral gossan atacado por <i>S. putrefaciens</i> . G = goethita; C = capgaronita; AJ = argentojarosita; S = siderita; V = vivianita.	153
Figura 61. Biolixiviación del mineral de gossan de Río Tinto con <i>A. hydrophila</i> . (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el ensayo.	154
Figura 62. Micrografías SEM del residuo obtenido en el ensayo de biolixiviación del mineral de gossan con <i>A. hydrophila</i> .	155
Figura 63. (a) Micrografía TEM de una célula de <i>A. hydrophila</i> con depósitos en la superficie. (b) Análisis EDS de una de las nanopartículas de la superficie celular.	155
Figura 64. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación del mineral de gossan con <i>A. hydrophila</i> . AJ = argentojarosita; G = goethita; M = magnetita; V = vivianita.	156
Figura 65. Comparación de la cinética de reducción del Fe(III) (a) y de la disolución del Fe(II) (b) por lixiviación del mineral de gossan con los diferentes cultivos.	157
Figura 66. Biorreducción del Fe(III) de jarositas de amonio y potasio, (a) en ausencia de AQDS y (b) con AQDS en el medio de cultivo.	165

Figura 67. Esquema de la reducción microbiana de minerales de Fe(III) por la acción de las sustancias húmicas como lanzadera de electrones entre los microorganismos y los sólidos férricos.	166
Figura 68. Cinética de reducción del hierro (III) de las jarositas de amonio y potasio con el consorcio en presencia y ausencia de AQDS.	167
Figura 69. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y potasio con el consorcio natural en presencia de AQDS. M = magnetita; J = jarosita.	168
Figura 70. Biorreducción del Fe(III) de jarositas de amonio y potasio con <i>S. putrefaciens</i> , (a) en ausencia de AQDS y (b) con AQDS en el medio de cultivo.	169
Figura 71. Cinética de reducción del Fe(III) de las jarositas de amonio y potasio con <i>S. putrefaciens</i> en presencia y ausencia de AQDS.	170
Figura 72. Cinética de reducción del Fe(III) de las jarositas de amonio y potasio con <i>A. hydrophila</i> en presencia y ausencia de AQDS.	171
Figura 73. Estructuras de los quelatos de hierro con: (a) citrato y (b) EDTA.	174
Figura 74. Efecto del citrato de sodio (60 mM) en la reducción del Fe(III) suministrado como jarosita de amonio y potasio (60 mM de Fe) y en la disolución del Fe(II) con el cultivo de <i>S. putrefaciens</i>	176
Figura 75. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y de potasio con <i>S. putrefaciens</i> en presencia de citrato como agente quelante.	177
Figura 76. Efecto del EDTA (60 mM) en la reducción del Fe(III) suministrado como jarosita de amonio y potasio (60 mM de Fe) y en la disolución del Fe(II) con el cultivo de <i>S. putrefaciens</i>	178
Figura 77. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y de potasio con <i>S. putrefaciens</i> en presencia de EDTA como agente quelante. J = jarosita; S = siderita.	178
Figura 78. Efecto del citrato de sodio (60 mM) en la reducción del Fe(III) suministrado como jarosita de amonio y potasio (60 mM de Fe) y en la disolución del Fe(II) con el cultivo de <i>A. hydrophila</i>	180
Figura 79. Difractograma de rayos X del residuo de la jarosita atacada por el cultivo de <i>A. hydrophila</i> en presencia de citrato como agente quelante.	181
Figura 80. Efecto de la adición de EDTA (60 mM) en la reducción del Fe(III) suministrado como jarosita de amonio y potasio (60 mM de Fe) y en la disolución del Fe(II) con el cultivo de <i>A. hydrophila</i>	182
Figura 81. Micrografía de SEM del cultivo del consorcio natural: (A) crecido sobre fibras de carbono y (B) crecido utilizando gossan como fuente de hierro.	185
Figura 82. Reconstrucción 3D obtenida mediante CLSM de la biopelícula formada por el consorcio bacteriano sobre mineral de gossan. Las células aparecen en color azul oscuro. La lectina empleada fue PWM.	186
Figura 83. Imágenes CLSM de la biopelícula producida por el consorcio natural con diferentes tinciones específicas para ácidos nucleicos para observar la distribución de sus células. La región fue teñida también con (A) Con A-FITC, (B) LcH-FITC, (C) WGA-FITC y (D) PWM-FITC. La última columna muestra una combinación de las dos señales. Barras de escala: 10 µm.	188

Figura 84. Cantidad de EPS producidas por célula de <i>S. putrefaciens</i> bajo diferentes condiciones: células planctónicas; células crecidas sobre soporte de fibras de carbón, empleando una fuente de hierro soluble en ambos casos; y células sobre mineral de gossan (fuente de hierro insoluble).	191
Figura 85. Espectros FTIR de los controles abióticos de los medios ensayados: con citrato férrico (azul) y con mineral (rojo).	193
Figura 86. Espectros FTIR de las EPS (coloidal en rojo y capsular en azul) de <i>S. putrefaciens</i> crecidas en: (A) citrato férrico, y (B) mineral de gossan.	195
Figura 87. Células planctónicas de <i>S. putrefaciens</i> : (a) micrografías de SEM y (b) imágenes CLSM. En las imágenes de CLSM de la biopelícula para mostrar la distribución de los microorganismos en la biopelícula, los ácidos nucleicos aparecen teñidos con SYTO 9 (verde) y los carbohidratos con la lectina Con A (rojo).	197
Figura 88. Micrografía de SEM de las fibras de carbono extraídas de un cultivo de <i>S. putrefaciens</i>	198
Figura 89. Imágenes CLSM de una región de la biopelícula teñida con SYTO 9 (verde), específico para ácidos nucleicos. La región fue teñida también con las lectinas conjugadas (A) PHAE-FITC, y (B) Con A-FITC, cuyas señales aparecen en rojo. Barras de escala: 20 µm.	199
Figura 90. Cantidad de EPS producidas por célula de <i>A. hydrophila</i> bajo diferentes condiciones: células planctónicas; células crecidas sobre soporte de fibras de carbón, empleando una fuente de hierro soluble; y células crecidas sobre mineral de gossan (fuente de hierro insoluble).	201
Figura 91. Espectros FTIR de EPS (coloidal en rojo y capsular en azul) de <i>A. hydrophila</i> crecidas en: (A) citrato férrico y (B) mineral de gossan como aceptor de electrones.	203
Figura 92. Imágenes de SEM y CLSM de <i>A. hydrophila</i> : células planctónicas (A, D), células adheridas a fibras de carbono (B, E) y sobre mineral de gossan (C, F). En las imágenes de CLSM de la biopelícula se muestra la distribución de las células mediante la tinción de los ácidos nucleicos con SYTO 9 (verde). Los carbohidratos se tiñeron con la lectina Con A (rojo).	208
Figura 93. Imágenes de CLSM de una región de la biopelícula producida por <i>A. hydrophila</i> sobre mineral gossan teñida con SYTO 62, tinte específico para ácidos nucleicos (rojo). La región se tiñó también con varias lectinas (verde): (A) Con A-FITC, (B) ECA-FITC, (C) UEA I-FITC, y (D) SBA-FITC. La última columna muestra una combinación de las dos señales. Barras de escala: 10 µm.	210
Figura 94. Micrografía de TEM de las células de <i>A. hydrophila</i> cultivadas con minerales de gossan como único aceptor de electrones.	212
Figura 95. Efecto del sustrato en la producción de nanohilos por <i>A. hydrophila</i> . Micrografías de SEM de células crecidas con citrato férrico soluble sobre: (A) láminas de vidrio, (B) pirita, (C) HOPG y (D) detalle de los nanohilos interconectando las células de la imagen C.	214
Figura 96. Gel SDS-PAGE de las proteínas extracelulares de <i>A. hydrophila</i> débilmente asociadas a la célula. Los números indican las bandas seleccionadas para su identificación.	217
Figura 97. (A) Imagen de AFM de la topografía de las células de <i>A. hydrophila</i> y de sus filamentos sobre HOPG. (B) Imagen de corriente obtenida mediante CP-AFM del mismo campo mostrado en la imagen A, al aplicar una diferencia de potencial entre la punta y la muestra.	220

Figura 98. (A) Imagen de AFM en modo de contacto intermitente (*peak force tapping mode*) del cultivo de *A. hydrophila* con una alta densidad de nanohilos bacterianos. Las células y los nanohilos se encuentran sobre la superficie de HOPG. (B) Perfil de la sección transversal de un nanohilo bacteriano. (C) Gráfico I/V obtenido con la punta de AFM situada sobre los nanohilos..... 220

Figura 99. Esquema de los modelos de flujo de electrones a lo largo de los nanohilos microbianos. (a) Modelo de saltos de electrones (*hopping*) y (b) conductividad metálica (deslocalización de electrones). 221

Figura 100. *N*-acil-homoserina lactonas. (A) Las AHLs producidas por bacterias Gram negativas varían por la sustitución en la posición C3 (R1) y por la longitud y la insaturación de la cadena acilo (R2). (B) Esquema propuesto para la descomposición de las AHLs inducida mediante colisión en los dos fragmentos iónicos principales (Gould et al., 2006). 223

Figura 101. Análisis MS de los compuestos activos del extracto de un cultivo de *A. hydrophila*..... 224

Figura 102. Efecto de la adición de AHLs en la formación de la biopelícula de *A. hydrophila*. Imágenes de SEM de la adhesión celular y de la formación de la biopelícula sobre carbón activado tras 1, 4 y 8 h de incubación. Fila A: cultivo control sin adición de AHL. Filas B-D: cultivos con 3-oxo-C8-AHL (B), 3-oxo-C12-AHL (C), y 3-oxo-C14-AHL (D). 225

Figura 103. Imágenes de SEM de la biopelícula formada por *A. hydrophila* sobre carbón activado tras 24 h de incubación: (a) cultivo sin tratamiento y (b) cultivo con 3-oxo-C14-AHL. 226

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

1.1.1. Situación actual de la industria siderúrgica y de la minería del hierro

El acero es indispensable en nuestra forma y nivel de vida actual y es esencial para el crecimiento económico. Los dos componentes principales del acero, el hierro y el carbono, se encuentran en abundancia en la naturaleza, lo que favorece su producción a gran escala. La gran variedad de aceros que se fabrican y su disponibilidad son factores que hacen que este material sea uno de los más importantes en ingeniería, siendo apto para numerosos usos como la construcción de maquinaria, herramientas, edificios y obras públicas. Las estimaciones realizadas por *U.S. Geological Survey* indican que las reservas mundiales de los minerales de hierro exceden los 800 billones de toneladas, conteniendo más de 230 billones de toneladas del metal.

Según la *World Steel Association*, la demanda mundial de acero se ve influenciada fuertemente por el rápido crecimiento de países emergentes como China, India, Brasil y Rusia. Las estadísticas de *U.S. Geological Survey* (Figura 1) indican que la producción mundial de mineral de hierro en 2010 alcanzó un total de 2400 millones de toneladas, con China a la cabeza de la industria como mayor productor y consumidor de este metal. La producción de China en 2010 fue de aproximadamente 900 millones de toneladas, el 37.5% de la producción mundial. La industria siderúrgica en China ha crecido a una velocidad anual superior al 20% durante los últimos años, mientras que la media global (excluyendo a China) creció al 7% anual.

La producción de acero no aleado se ha incrementado un 66% desde el año 2001. Este gran aumento es una consecuencia directa de su consumo para la actual industrialización de Asia, más concretamente de India y China. Estos países han aumentado la producción de este material un 315% y un 145% entre 2001 y 2010, respectivamente. La figura 2 muestra la producción de acero desde 2001.

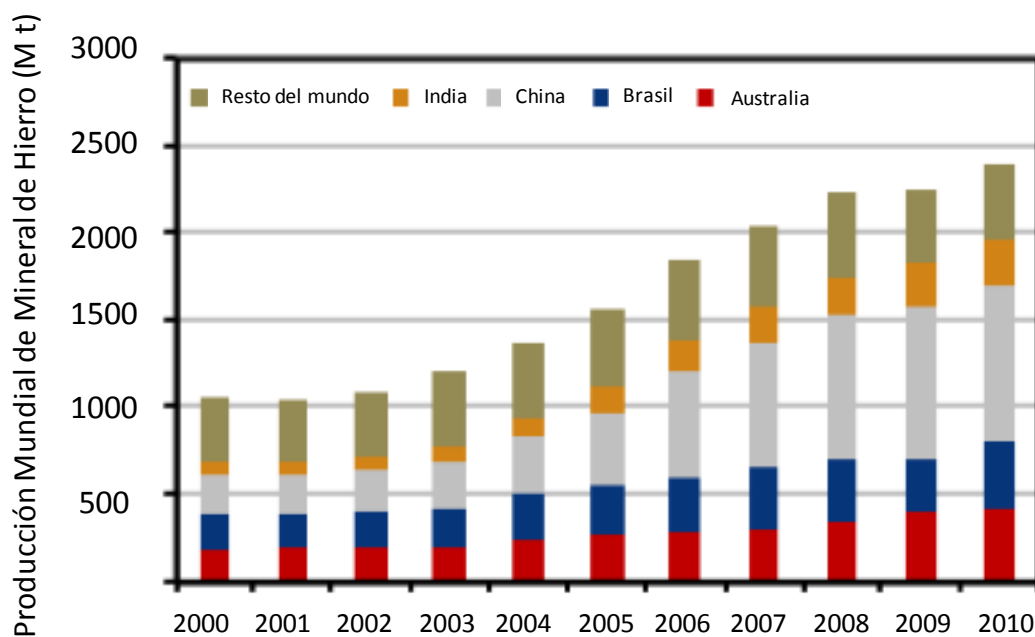


Figura 1. Evolución de la producción mundial de mineral de hierro entre los años 2000 y 2010. Fuente: *U.S. Geological Survey* (2003-2010), *TD Newcrest* (2011(esperado)-2012(esperado)) (<http://minerals.usgs.gov/>).

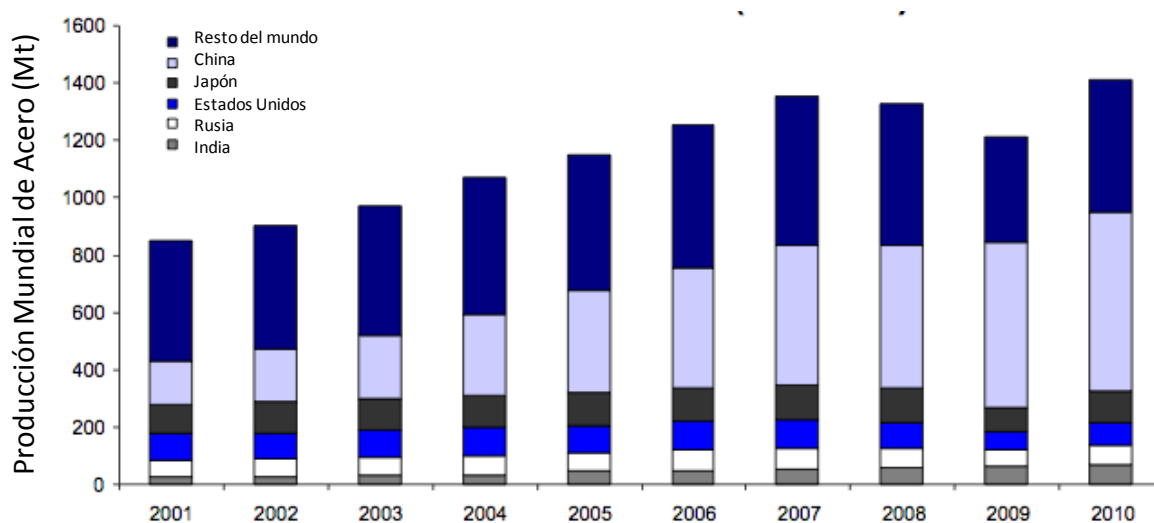
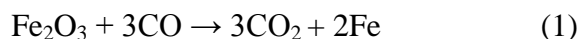


Figura 2. Producción mundial de acero (Mt). Fuente: *World Steel Association* (<http://www.worldsteel.org/>).

La industria del acero aleado es el cliente más destacado de la minería del hierro. A través de un proceso de reducción, el mineral es transformado en arrabio líquido o en productos sólidos con un contenido de hierro del 90 al 95%. Ambos productos constituyen el paso previo a la fabricación del acero. Los materiales básicos empleados

en la producción del arrabio son mineral de hierro, coque y caliza. El alto horno es, virtualmente, una planta química que reduce continuamente el hierro del mineral. El coque se quema como combustible para calentar el horno y se transforma, además, en monóxido de carbono, que se combina con los óxidos de hierro del mineral y los reduce a hierro metálico. La reacción química fundamental en un alto horno es:



El arrabio contiene demasiado carbono y otras impurezas para ser provechoso. Debe ser refinado porque, esencialmente, el acero es hierro que contiene menos de un 2% de carbono.

Actualmente, se utilizan dos tecnologías para producir acero: el convertidor con soplado de oxígeno (BOF) y el horno eléctrico de arco. El convertidor se alimenta con arrabio y un pequeño porcentaje de chatarra de hierro, mientras que el horno eléctrico de arco se carga únicamente con chatarra y/o hierro obtenido por reducción directa.

1.1.2. El problema de las emisiones de CO₂ en la industria del acero

En este siglo, como se ha mencionado anteriormente, se necesitará incrementar el volumen de producción de acero a nivel mundial. Por otro lado, los países industrializados acordaron en Kioto reducir sus emisiones de gases de efecto invernadero. El protocolo de Kioto, ratificado por 187 países hasta 2009, estableció el objetivo de reducir las emisiones de seis gases contaminantes (dióxido de carbono, CO₂; metano, CH₄; óxido nitroso, N₂O; hidrofluorocarbonos, HFC; perfluorocarbonos, PFC; y hexafluoruro de azufre, SF₆), la mayoría producidos en la combustión de carbón, petróleo y otros hidrocarburos, en un porcentaje aproximado de al menos un 5 %, dentro del periodo que va desde el año 2008 al 2012, en comparación con las emisiones del año 1990.

En la figura 3 se presentan las emisiones mundiales de CO₂ causadas por el consumo de combustibles fósiles a lo largo del siglo pasado. Hoy en día, la industria mundial del acero produce entre el 4 y el 5% de los gases de efecto invernadero de origen humano. La media de CO₂ producido en la industria siderúrgica es de 1,9 toneladas de CO₂ por

tonelada de acero producido. Teniendo en cuenta la producción mundial de acero, la industria siderúrgica produce alrededor de 2.000 millones de toneladas de CO₂.

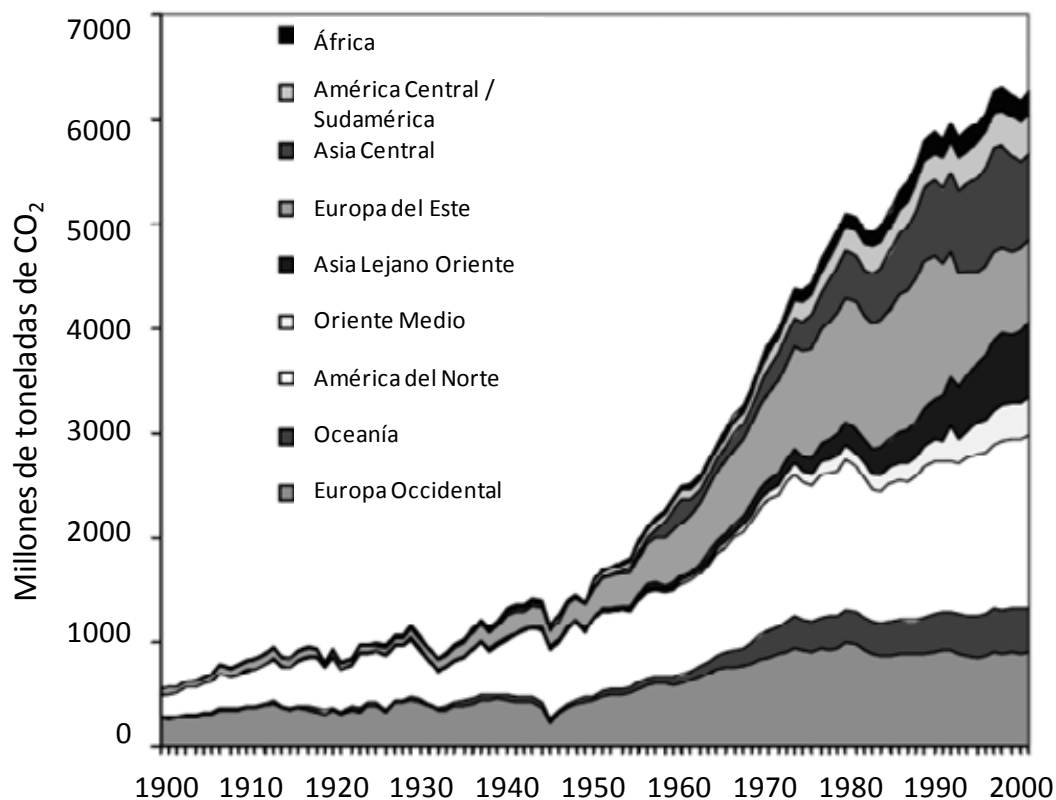


Figura 3. Tendencia mundial de las emisiones de CO₂ entre los años 1900 y 2000 (Kundak et al., 2009).

La mayor parte del CO₂ generado por la industria del acero procede de la interacción química entre el carbón y el mineral de hierro en los altos hornos. Actualmente, la tecnología convencional es muy eficiente y el proceso de reducción opera cerca de los límites termodinámicos. No obstante, la disminución de las emisiones de dióxido de carbono no será posible si sólo se emplean métodos pirometalúrgicos convencionales para la extracción del hierro.

El uso de hornos eléctricos de arco o la reducción directa del mineral de hierro con hidrógeno conllevaría una mayor disminución de las emisiones de CO₂ durante la producción del acero. Sin embargo, la primera de estas dos tecnologías sólo sería factible con un abaratamiento de la energía eléctrica o mediante su obtención a través de

fuentes renovables o en centrales nucleares. Además, la cantidad de chatarra disponible no es suficiente para satisfacer la demanda del mercado y sus precios han aumentado notablemente en los últimos años. Por otro lado, el precio de los pellets o briquetas de mineral reducido con hidrógeno es alto debido al alto coste de este gas. Por todo ello, se espera que en el futuro inmediato se siga utilizando la reducción con carbón en la producción de acero.

1.1.3. La biolixiviación como alternativa

La extracción y purificación de metales a partir de materias primas minerales son procesos que frecuentemente emplean reactivos químicos tóxicos, tienen una demanda energética alta y generan productos que contaminan el medioambiente. Hay un interés creciente en la investigación de procesos más ecológicos que permitan la recuperación de metales, tanto por los posibles riesgos medioambientales y por una legislación cada vez más restrictiva, como por un interés económico e industrial. Un método alternativo a los métodos convencionales de recuperación de hierro a partir de minerales podría ser la biolixiviación (Brandl, 2008).

Los microorganismos, y en particular las bacterias, están expuestos con frecuencia a condiciones extremas y su capacidad para resistir estas situaciones es esencial para su supervivencia. Las bacterias desarrollan mecanismos de defensa específicos para superar la toxicidad de las altas concentraciones de metales presentes en los ambientes acuosos en los que habitualmente crecen. Estos mecanismos incluyen alteraciones en la solubilidad y en la toxicidad mediante cambios en el estado de oxidación de los iones metálicos, complejación extracelular o precipitación de los metales intracelularmente (Gadd, 2010; Vera et al., 2013). Tales procesos son la base de algunas aplicaciones biotecnológicas importantes de los microorganismos como la biolixiviación, la corrosión microbiana y la biomineralización.

El interés de los científicos por los microorganismos como potenciales agentes lixiviantes se ha desarrollado rápidamente durante las dos últimas décadas. La recuperación de metales pesados mediante el uso de microorganismos es un proceso biotecnológico ampliamente establecido (Hallberg et al., 2011; Vestola et al., 2010).

Estas técnicas se emplean fundamentalmente en el caso de metales como cobre, cobalto, níquel, zinc y uranio. Tales metales se extraen generalmente de sulfuros insolubles o, en el caso del uranio, de óxidos. La aplicación de la biolixiviación en la recuperación de oro y plata está enfocada a la disolución de minerales que interfieren en el tratamiento de cianuración.

Los procesos de biolixiviación que conllevan la disolución de hierro son muy prometedores ya que presentan varias aplicaciones con un valor industrial significativo (Eisele and Gabby, 2014):

1. La eliminación de impurezas de hierro de materiales donde este metal produce unas características indeseables. Algunos ejemplos serían la purificación del caolín o de la sílice, ya que el hierro le da color (Štyriaková, 2007), o la eliminación de hierro de la bauxita para mejorar sus características desde el punto de vista de la obtención del aluminio (Papassiopi et al., 2010).
2. La recuperación de hierro procedente de menas resistentes a los procesos de concentración convencionales. Una ruta hidrometalúrgica permitiría recuperar y concentrar el hierro de estos minerales para un tratamiento posterior.
3. La liberación y recuperación de otros metales de mayor valor mediante la disolución de los minerales férricos a los que están asociados. Un ejemplo sería el tratamiento de lateritas de níquel para favorecer su lixiviación (Hallberg et al., 2011).

Una ventaja importante de la biolixiviación reductora del hierro es que las sales de hierro ferroso son mucho más solubles que las sales de hierro férrico y se pueden disolver con una cierta facilidad. Por otro lado, la disolución de hierro se ve acelerada por la formación microbiana de ácidos orgánicos que pueden complejar el hierro e incrementar su solubilidad.

En hidrometalurgia, la lixiviación bacteriana es más sencilla, barata y ecológica que los procesos convencionales de lixiviación. Los microorganismos se cultivan en condiciones similares a las que se dan en el ambiente de las minas manteniéndose el ciclo de crecimiento de forma natural. Una de sus principales ventajas es la económica debido a que se aprovechan minerales de baja ley. Los minerales denominados así

tienen una concentración del metal de interés muy baja y su extracción por métodos químicos tradicionales no es rentable, por ello no se explotan a pesar de que puedan contener elementos valiosos como oro, plata, cobre y metales radiactivos (Olson et al., 2003; Rohwerder et al., 2003).

Sin embargo, la biolixiviación también presenta algunos inconvenientes. Así, el proceso es lento, lo cual disminuye los beneficios y repercute en un retraso significativo a la hora de recuperar el dinero invertido en la puesta en marcha de nuevas plantas. Además, la implantación de este proceso debe planificarse cuidadosamente para evitar las filtraciones de algunos productos tóxicos hacia la capa freática o la formación de precipitados con alto contenido en metales pesados (Gadd, 2010).

1.2. Ciclo geomicrobiológico del hierro. Aspectos generales

El hierro es el metal de transición más frecuentemente utilizado en la biosfera. El hierro es ubicuo en nuestro planeta, tanto si se encuentra en forma sólida, como partículas de minerales que contienen hierro férrico o ferroso, o como iones disueltos en un medio acuoso. Las transformaciones redox del hierro, así como su precipitación y disolución, son debidas a procesos químicos y microbiológicos reflejados en su ciclo geomicrobiológico (Figura 4). Las transformaciones en las que hay microorganismos involucrados suelen ocurrir mucho más rápidamente que las respectivas reacciones químicas. Los microorganismos también desempeñan un papel importante en otros ciclos (bio)geoquímicos, en particular en el ciclo del carbono (Kappler and Straub, 2005).

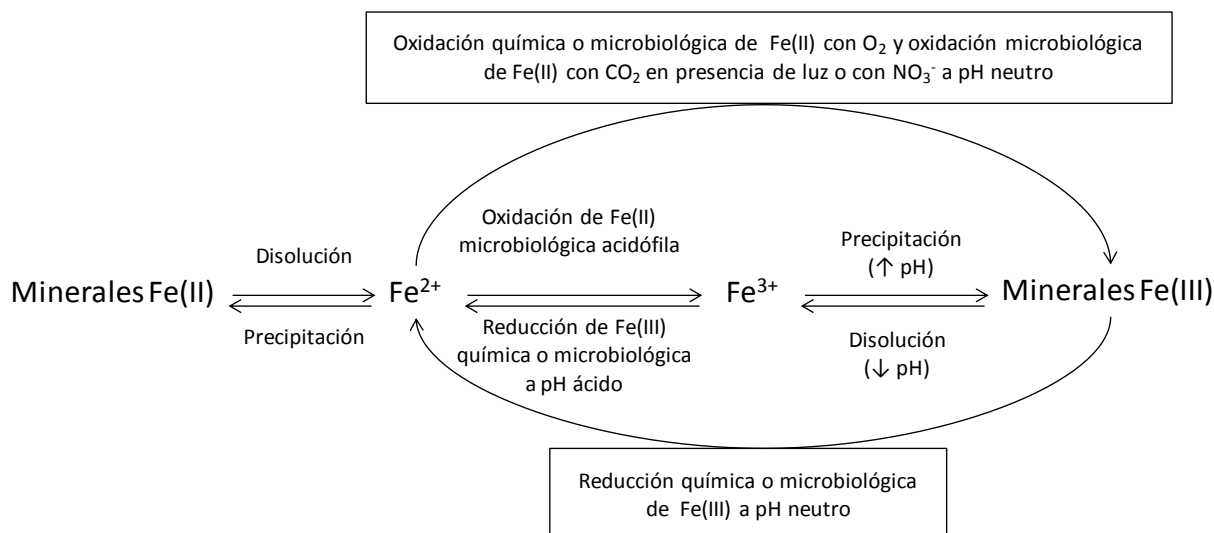


Figura 4. Ciclo geomicrobiológico del hierro

En medios aerobios ácidos, el proceso predominante es la oxidación microbiana de hierro asociada a la oxidación de especies de azufre reducidas. Diferentes microorganismos pueden catalizar la oxidación de ion ferroso dependiendo de las condiciones del medio: *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* en medios ácidos y a temperaturas moderadas, *Gallionella* a pH neutro y *Sulfolobus* en medios termófilos y ácidos.

En medios anaerobios predomina la reducción del hierro asociada a la oxidación de compuestos orgánicos, generándose Fe(II) tanto soluble como en forma de precipitados insolubles. Parte del Fe(II) difunde a zonas aerobias donde se reoxida dando lugar a minerales de Fe(III) que permiten que continúe el ciclo. El hierro es el único aceptor terminal de electrones que puede reoxidarse regenerando el ciclo.

A diferencia de la mayoría de los aceptores de electrones, el Fe (III) tiene una solubilidad muy baja y normalmente aparece formando óxidos insolubles a pH cercano al neutro. En medios muy ácidos o muy básicos, los óxidos de hierro pueden disolverse por su carácter anfótero. Además, el hierro puede aparecer en depósitos minerales formando óxidos y oxihidróxidos con distintas estructuras cristalinas y diferentes estados de oxidación del metal. Hay distintos minerales de Fe(II), como la pirita o la siderita, de Fe(III), como la hematita o la goethita, y minerales mixtos de Fe(II) y Fe(III), como la magnetita, que pueden ser utilizados, producidos o transformados por la

acción microbiana. La gran variedad de estructuras cristalinas de los compuestos de hierro, aunque su fórmula química sea la misma, implica que las condiciones cinéticas y termodinámicas de transformación pueden ser diferentes.

El hierro en la naturaleza raramente aparece como minerales puros con una sola fase cristalina, sino que se presenta bajo las siguientes formas (Kappler and Straub, 2005):

- Asociado o cubierto de materia orgánica, como sustancias húmicas o polisacáridos procedentes de biopelículas.
- En partículas minerales sobre las cuales se han adsorbido aniones, como fosfatos o arseniatos, o cationes metálicos, como Cu^{2+} o Mn^{2+} .
- En minerales en los cuales otros cationes, como Al, Cr y Mn, han sido parcialmente sustituidos por hierro.
- Como minerales mezclados o coprecipitados con otros minerales.
- Como partículas minerales de tamaño nanométrico en forma de agregados (coloides).
- Complejados, por ejemplo, por ácidos orgánicos que lo mantienen en disolución.

Esta complejidad genera una gran diversidad de ambientes naturales en los que diferentes grupos de procariotas pueden utilizar este hierro como sustrato para obtener energía.

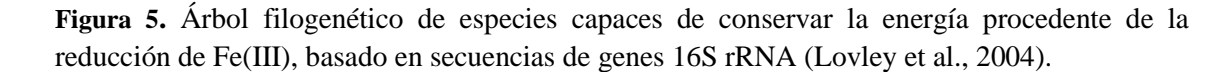
1.3. Bacterias reductoras de hierro

Aunque el hierro es un elemento muy abundante en la corteza terrestre, no está muy disponible y, a pesar de que los suelos y los sedimentos son ricos en este metal, se le considera un elemento traza en los medios acuáticos. El hierro tiene un papel muy importante en el crecimiento de los distintos organismos. La reducción asimilatoria de hierro consiste en la reducción de Fe^{3+} con el fin de incorporarlo intracelularmente a las proteínas. Por otro lado, la reducción desasimilatoria de hierro sirve para generar energía para el desarrollo celular (Schröder et al., 2003). Hasta hace poco tiempo, se pensaba que la reducción de Fe(III) en sedimentos y medios bajo la superficie tenía lugar mediante procesos abióticos. Se creía que la transformación de Fe(III) a Fe(II) se

producía a través de cambios en el pH y/o en el potencial redox. Sin embargo, todas las investigaciones realizadas recientemente indican que la reducción desasimilatoria de hierro es un proceso geomicrobiológico, relevante en suelos, sedimentos y acuíferos (Lovley and Phillips, 1986a, b).

En la reducción desasimilatoria, la reductasa de hierro férrico actúa como reductasa terminal de una cadena de transporte electrónico asociada a la membrana citoplasmática. La reducción de hierro férrico está asociada a la generación de una fuerza protón-motriz a través de la membrana citoplasmática que permite producir ATP mediante una ATPsintasa de la membrana que se utilizará para el transporte activo de nutrientes o para la movilidad de la célula. Como en el caso de la respiración del azufre, se cree que la reducción desasimilatoria del hierro es uno de los procesos de generación de energía más antiguos que habría evolucionado a lo largo de la historia de la Tierra. Se sabe poco sobre las reductasas de hierro férrico desasimilatorias y del mecanismo a través del cual la reducción de hierro se asocia a la producción de energía; sin embargo, parece que éstas no tienen ninguna relación con las reductasas de hierro asimilatorias que se han caracterizado hasta el momento. La aparición de las reductasas de hierro desasimilatorias se produjo hace unos 3500 millones de años. Parece ser que en este periodo el hierro férrico se formó por la acción de radiaciones ultravioleta muy intensas y como resultado de la fotosíntesis anaerobia en la que se utilizaba el Fe^{2+} como dador de electrones.

Actualmente, los grupos de bacterias y archeas que utilizan el hierro en su respiración son muy distintos. Muchos sedimentos y suelos contienen minerales férricos y, en consecuencia, el Fe(III) es el aceptor final de electrones más abundante en muchos medios localizados bajo la superficie terrestre. La reducción desasimilatoria de hierro no sólo influye en la distribución del hierro en el medio, sino que también repercute en la movilización y en la transformación de otros metales y nutrientes, y juega un papel importante en la degradación de materia orgánica. Además de contribuir al correcto funcionamiento de los ecosistemas naturales, el interés en este tipo de microorganismos reside en las potenciales aplicaciones prácticas que tiene la biorreducción desasimilatoria de Fe(III) en la biorremediación de ambientes contaminados con compuestos orgánicos y/o metales pesados (Gadd, 2010), así como en la obtención de electricidad a partir de sedimentos acuáticos y materia orgánica, es decir, en las pilas



1.3.1. Microorganismos fermentativos

Muchos microorganismos que crecen vía metabolismo fermentativo pueden utilizar el Fe(III) como aceptor de electrones alternativo durante la fermentación, aunque su crecimiento también es posible sin Fe(III). Algunos de ellos se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos fermentativos reductores de Fe(III).

Bacteria fermentativa	Dador de electrones	Fuente de Fe(III)	Referencia
<i>Aerobacter sp.</i>	Glucosa	Ferrihidrita	(Ottow, 1970)
<i>Bacillus sp.</i>	Glucosa	Limonita, goethita, hematita	(Castro and Ehrlich, 1970)
<i>Clostridium butyricum</i>	Glucosa	Hematita	(Hammann and Ottow, 1974)
<i>Clostridium celerecrecens</i>	Lactato	Fe(III)-cit	(García-Balboa et al., 2010)
<i>Escherichia coli</i>	Glucosa	Hematita	(Ottow, 1970)
<i>Fusarium solani</i>	Glucosa	Hematita	(Ottow and Von Klopotek, 1969)
<i>Pseudomonas</i> (varias especies)	Glucosa	Hematita	(Ottow and Glathe, 1971)
<i>Serratia marcescens</i>	Glucosa	Hematita	(Ottow, 1970)
<i>Serratia fonticola</i>	Lactato	Fe(III)-cit	(García-Balboa et al., 2010)
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Azufre elemental	Fe(III)-Cl ₃	(Brock and Gustafson, 1976)
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Azufre elemental	Fe(III)-Cl ₃	(Brock and Gustafson, 1976)
<i>Vibrio sp.</i>	Glucosa, malato, piruvato	Fe(III)-Cl ₃	(Jones et al., 1984)

Durante la fermentación, la mayor parte de los electrones se transfieren de los sustratos orgánicos que actúan como dadores a los productos de la reacción, compuestos orgánicos e hidrógeno que actúan como aceptores. En general, en la fermentación bacteriana, menos del 5% de los electrones se ceden al hierro férrico. No obstante, cuando se suministra Fe(III) como aceptor único de electrones en el cultivo de microorganismos fermentativos, se alcanzan cantidades significativas de Fe(II).

Aunque la fermentación en la que se transfiere parte de los electrones al Fe(III) es energéticamente más favorable que la que tiene lugar sin reducción de Fe(III), esto no repercute en un incremento del crecimiento celular.

1.3.2. Microorganismos sulfatorreductores

Muchos microorganismos respiratorios que crecen en condiciones de anaerobiosis utilizando el sulfato como aceptor de electrones, también son capaces de reducir el Fe(III) enzimáticamente. Además, los dadores de electrones que intervienen en la reducción del Fe(III) y en la reducción de sulfato son los mismos. En la tabla 2 se presentan algunos microorganismos sulfatorreductores; sin embargo, ninguno es capaz de reducir el Fe(III) cuando se suministra como aceptor único de electrones.

Se ha observado que el intermediario en el transporte electrónico durante la reducción de sulfato, un citocromo tipo c, puede actuar como una reductasa de Fe(III). La reducción del hierro férrico mediante microorganismos sulfatorreductores podría ser una estrategia para acelerar la desaparición del hierro ferroso y, de esta manera, favorecer las condiciones para la reducción de sulfato. No obstante, no se ha comprobado que estos microorganismos sean capaces de obtener energía mediante el proceso de reducción de hierro.

Sólo el microorganismo sulfatorreductor *Desulfotomaculum reducens* es capaz de crecer utilizando la energía generada en la reducción de Fe(III), Mn(IV), U(VI) y Cr(VI).

Tabla 2. Microorganismos sulfatorreductores reductores de Fe(III).

Bacterias sulfatorreductoras	Dador de electrones	Fuente de Fe(III)	Referencia
<i>Desulfobacter postgatei</i>	Acetato	Fe(III)-NTA	(Lovley et al., 1993b)
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	H ₂	Fe(III)-NTA	(Lovley et al., 1993b)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Lactato	Fe(III)-Cl ₃	(Jones et al., 1984)
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Lactato	Fe(III)-NTA	(Lovley et al., 1993b)
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	Lactato	Fe(III)-Cl ₃	(Jones et al., 1984)
<i>Desulfosporosinus orientis</i>	Lactato, acetato	Sedimentos	(Küsel et al., 2001)

1.3.3. Microorganismos que conservan la energía de la reducción de Fe(III)

Los microorganismos que respiran Fe(III) para obtener energía para el crecimiento celular son filogenética y morfológicamente muy diversos. La mayoría de los microorganismos Fe(III)-reductores oxidan compuestos orgánicos o hidrógeno, pero también algunos microorganismos acoplan la reducción de Fe(III) a la oxidación de azufre elemental para su crecimiento a pH ácidos.

Microorganismos acidófilos reductores de Fe(III)

El Fe(III) es muy insoluble a pH neutro pero es soluble a pH ácido. Además, el potencial redox del par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ es significativamente más positivo que el del par óxido de Fe(III)/ Fe^{2+} , y la oxidación de dadores de electrones, tales como el azufre elemental, que no sería favorable a pH neutro con óxidos de hierro como aceptores electrónicos, sí

tendría lugar a pH ácido donde el Fe^{3+} es más disponible (Barrie Johnson and Hallberg, 2008).

En general, los microorganismos acidófilos son capaces de reducir Fe(III) a Fe(II); sin embargo, el grado de reducción varía significativamente entre unos y otros (Johnson, 2012; Johnson and McGinness, 1991).

Algunas especies de *Acidithiobacillus* y la archaia termófila *Sulfolobus acidocaldarius* son capaces de llevar a cabo la reducción de Fe(III) en anaerobiosis. Las bacterias del género *Acidithiobacillus* pertenecen a las γ -*Proteobacteria* y presentan como características comunes que son extremadamente acidófilas y que crecen autotróficamente utilizando azufre elemental y algunas otras de sus formas reducidas como fuente de energía. *At. thiooxidans* es capaz de reducir hierro férrico en condiciones aerobias, por lo que el Fe(III) y el oxígeno podrían ser respirados simultáneamente. *At. ferrooxidans* puede mantener el crecimiento autotrófico en condiciones de anaerobiosis con azufre elemental como dador de electrones y Fe(III) como aceptor (Pronk et al., 1992). También el hidrógeno puede actuar como dador de electrones (Ohmura et al., 2002). En la actualidad parece que de las especies clasificadas como *Acidithiobacillus* spp., sólo *At. ferrooxidans* puede crecer mediante la respiración de hierro.

Otros microorganismos procedentes de medios extremadamente ácidos y con altos contenidos en metales con capacidad para reducir el hierro férrico soluble son las bacterias mesófilas y heterotróficas de los géneros *Acidiphilium*, *Acidocella* y *Acidomonas*. El 40% de las especies mesófilas aisladas son capaces de reducir hierro con efectividad desigual, en condiciones aerobias. Es interesante destacar que la reducción acidófila no requiere anaerobiosis sino que ocurre a mayor velocidad en condiciones microóxicas (Johnson et al., 1993). Una de las especies Fe(III)-reductoras más eficientes es *Acidiphilium* sp. SJH. Esta bacteria es capaz de reducir diferentes formas de Fe(III) utilizando glucosa. *Acidiphilium cryptum* JF-5 puede crecer en ausencia de oxígeno respirando hierro férrico mediante la oxidación de azúcares, algunas moléculas de bajo peso molecular o hidrógeno (Kusel et al., 1999). Además, esta bacteria es capaz de acelerar la disolución de muchos minerales férricos. El contacto directo célula/mineral no es necesario ya que el proceso tiene lugar mediante la disolución indirecta del hierro por la producción bacteriana de un compuesto

extracelular (Bridge and Johnson, 2000). La adición de quelantes del hierro también favorece la disolución de los minerales. Se ha aislado una bacteria heterotrófica termoacidófila, *Acidicaldus organivorans*, capaz de reducir hierro y que, a diferencia de las otras acidófilas heterotróficas, puede crecer en anaerobiosis estricta utilizando el hierro como único aceptor de electrones (Johnson et al., 2006).

Otro grupo de acidófilas son mixotróficas, pueden usar dadores de electrones inorgánicos (Fe(II) o azufre reducido) y asimilar carbono tanto orgánico como inorgánico. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* y *Sulfobacillus acidophilus* pueden crecer anaeróbicamente respirando hierro y acelerar la disolución de algunos minerales férricos utilizando glicerol preferentemente, pero también tetrionato si crece en medios inorgánicos (Bridge and Johnson, 1998). *Alicyclobacillus* spp. puede usar hierro o azufre como dadores de electrones pero tiene una fisiología más inclinada al metabolismo heterotrófico que *Sulfobacillus* spp. (Yahya et al., 2008).

Las archeas *Ferroplasma* spp. son organismos anaerobios facultativos que respiran Fe(III) en ausencia de oxígeno (Dopson et al., 2004).

Microorganismos oxidantes de compuestos orgánicos

El primer cultivo puro que se aisló, capaz de oxidar ácidos orgánicos y alcoholes usando Fe(III) como aceptor de electrones, fue *Geobacter metallireducens*, una especie anaerobia estricta. La mayoría de las bacterias reductoras de hierro conocidas pertenecen a la familia *Geobacteraceae* y son las bacterias aisladas más frecuentemente de una gran variedad de ambientes sedimentarios. Son miembros de la subdivisión δ de *Proteobacteria*, que incluye a géneros como *Delsulfuromonas*, *Pelobacter* y *Desulfuromosa* (Lovley, 2013). Son capaces de oxidar completamente compuestos orgánicos a dióxido de carbono con Fe(III) o Mn(IV) como únicos aceptores de electrones (Lovley et al., 1993a). Algunas de estas especies pueden oxidar acetato y otros ácidos orgánicos, incluyendo ácidos grasos de cadena larga; así como compuestos aromáticos. Además, las especies de *Geobacter* son los componentes mayoritarios de las comunidades microbianas en sedimentos acuáticos donde el Fe(III) es el aceptor de electrones principal. La capacidad de las especies *Geobacter* para transferir electrones a

minerales insolubles, electrodos y, probablemente, a otros microorganismos puede deberse a unos pilis que conducen electrones con conductividad metálica (Childers et al., 2002; Reguera et al., 2005; Reguera et al., 2006). Los citocromos no intervienen en esta transferencia de electrones pero son importantes para establecer los contactos con los minerales férricos y con los electrodos. Estas propiedades podrían dar lugar a contribuciones importantes en el campo de la bioelectrónica.

La capacidad de reducir Fe(III) no se limita a las *Proteobacterias*. Otras especies como *Geovibrio ferrireducens* y *Geotrix fermentans*, que no están próximas a las especies descritas anteriormente, tienen mayores diferencias filogenéticas, pero también son capaces de emplear el hierro como aceptor de electrones dando una idea de la gran diversidad de organismos reductores de Fe(III) (Lovley et al., 2004). Estos organismos se han aislado en sedimentos contaminados con petróleo. *Geotrix fermentans* es una bacteria anaerobia estricta que crece utilizando varios ácidos orgánicos simples como dadores de electrones (acetato, propionato, lactato y fumarato) cuando el hierro es el aceptor de electrones; además, produce moléculas lanzadera de electrones con actividad redox basadas en la flavina en presencia de Fe(III), lo que favorece su reducción (Coates et al., 1999).

Ferribacter limneticum es el único microorganismo de la subclase β de las *Proteobacterias* que utiliza la energía de la reducción del Fe(III) pero no es capaz de utilizar el Mn(IV) (Cummings et al., 1999). Esta especie sólo se ha aislado en los sedimentos de lagos originados por el impacto de la minería.

En la subclase γ de *Proteobacteria* hay varios géneros que pueden crecer de manera aerobia, a diferencia de todos los microorganismos que se han mencionado anteriormente. Aquí, se incluyen especies como *Shewanella*, *Ferrimonas* y *Aeromonas*. En condiciones de anaerobiosis, pueden utilizar Fe(III), Mn(IV) u otros aceptores electrónicos. Aunque estos organismos pueden usar una gran variedad de dadores de electrones cuando hay oxígeno disponible, en condiciones de anaerobiosis sólo pueden producir energía para su desarrollo mediante la reducción de Fe(III) utilizando H₂ y ácidos orgánicos como dadores de electrones (Lovley, 2013).

A continuación, se presenta una breve descripción de las especies puras empleadas en este estudio debido a sus aplicaciones potenciales en la reducción de los minerales de hierro.

1.3.3.1. *Shewanella putrefaciens*

Las especies de *Shewanella* pertenecen a la subclase γ de las *Proteobacteria* y han sido los microorganismos reductores de Fe(III) más intensamente estudiados (Lovley et al., 2004). Son organismos anaerobios facultativos que crecen rápidamente y se encuentran en medios muy diversos.

S. putrefaciens es una bacteria Gram-negativa que ha sido aislada de medios marinos y de sedimentos anaerobios. Es capaz de reducir hierro y manganeso metabólicamente como aceptor de electrones terminal en su cadena de transporte de electrones (Haas and DiChristina, 2002; Myers and Nealson, 1990). *S. putrefaciens* también es capaz de obtener energía de la reducción de U(VI) a U(IV), lo que tiene importantes implicaciones en la formación de depósitos de uranio (Wade and DiChristina, 2000). La gran versatilidad de su metabolismo hace que sea capaz de reducir metales, metaloides e, incluso, radionucleídos cuando crece en condiciones de anaerobiosis (Blakeney et al., 2000; Myers et al., 2000). Las especies de *Shewanella* llevan a cabo una oxidación incompleta de cadenas multicarbonadas pequeñas, como el lactato, que actúan como dadores de electrones obteniéndose acetato (Arnold et al., 1990).

Se ha tratado de purificar e identificar las proteínas de la especie *Shewanella* involucradas en la respiración anaerobia. Los citocromos tipo c, que se encuentran en el espacio periplasmático o asociados a la membrana de las células, son los principales responsables de la reducción de hierro y manganeso. Aproximadamente, el 80% de la actividad reductora del hierro se localiza en la membrana externa de la célula, mientras que el 20% restante se encuentra en la región periplasmática y no se observa una actividad significativa en el citoplasma. Esta distribución le permitiría utilizar minerales insolubles como sustrato (Roberts et al., 2006). En la membrana externa de *Shewanella* hay proteínas que contienen cuatro citocromos c que podrían ser reducidos por formiato y reoxidados por el Fe^{3+} o por el Mn^{4+} y, por tanto, una o varias de estas proteínas

podrían constituir la reductasa de hierro (Myers and Myers, 1992). Además, esta reductasa también sería responsable de ceder electrones a la materia orgánica como las sustancias húmicas. También se ha observado que varias cepas de *Shewanella putrefaciens* son capaces de producir sideróforos del tipo hidroxamato cuando escasea el hierro (Gram, 1994).

Las especies *Shewanella* no necesitan adherirse a las partículas de óxido de hierro para respirar puesto que son capaces de secretar moléculas que actúan como lanzadera de electrones (Kim et al., 2002). Se han detectado riboflavina y riboflavina-5'-fosfato en el sobrenadante de los cultivos de *Shewanella putrefaciens* cuando se le hace crecer en presencia de un electrodo aceptor de electrones (Marsili et al., 2008). La flavina es el componente principal y, cuando se elimina del medio, la velocidad de transferencia de electrones al electrodo se reduce más del 70%, por lo que esta molécula actúa como transportador de electrones entre la superficie de la célula y los aceptores de electrones externos. La riboflavina se absorbe rápidamente en superficies de interés geoquímico como los oxihidróxidos de Fe(III) y de Mn(IV), pudiendo modificar la superficie de los minerales. Por otro lado, los anillos de isoaloxazina, un compuesto heterocíclico formado por un anillo bencénico, una pteridina y dos grupos carbonilo, actúan como quelantes de metales. Se puede apreciar, por tanto, la complejidad de la respiración de *Shewanella* al utilizar minerales insolubles.

1.3.3.2. *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas spp. es un género de bacterias ubicuas que se han encontrado en muchos medios acuáticos, incluyendo aguas de pozos, aguas cloradas embotelladas y aguas altamente contaminadas. Pueden causar infecciones a invertebrados y vertebrados y están incluidas en la lista de contaminantes candidatos de la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (*Contaminants Candidate List, CCL*).

Aeromonas spp. son bacterias Gram-negativas, quimioorganotrofas y anaerobias facultativas capaces de llevar a cabo una reducción desasimilatoria de metales (Seshadri et al., 2006). Se han realizado muchos estudios sobre el impacto de las especies de *Aeromonas* en el medio fundamentalmente motivados por su papel en la salud pública.

Sin embargo, se sabe muy poco de los mecanismos que confieren a esta bacteria la versatilidad metabólica que le permite sobrevivir en ambientes acuáticos, incluso en aguas contaminadas, o que le facilitan las interacciones ecológicas con otros organismos tanto procariotas como eucariotas (Khajanchi et al., 2009; Swift et al., 1997). Además, el papel que desempeña *Aeromonas* spp. en los ciclos de diferentes nutrientes y su potencial en biorremediación son relativamente desconocidos.

A. hydrophila es capaz de responder con rapidez a cambios en las condiciones ambientales, lo que permite su ubicuidad en los medios acuáticos. *A. hydrophila* puede llevar a cabo la respiración anaerobia con nitrato, Fe(III), Co(III), Se(VI) o fumarato. No obstante, el rendimiento de la reducción y el crecimiento celular al utilizar oxihidróxidos de Fe(III) amorfos es pobre, aunque se ve favorecido por la adición de agentes quelantes (Knight and Blakemore, 1998).

A. hydrophila utiliza varios aceptores de electrones; sin embargo, hay pocos dadores de electrones que favorezcan su crecimiento. La reducción de Fe(III) se produce con glicerol, succinato y lactato, pero la reducción observada con piruvato es fermentativa.

La reducción de Fe(III) por *A. hydrophila* es desasimilatoria y enzimática; además, el crecimiento celular está asociado a esta reducción. Hay muy pocos estudios sobre el mecanismo de reducción de Fe(III) en presencia de *A. hydrophila* pero parece que tiene lugar a través de una reductasa de hierro asociada a la membrana. Los citocromos tipo c estarían involucrados en la transferencia de electrones a los aceptores. Parece ser que la reducción de Fe(III) por *A. hydrophila* estaría asociada a una cadena respiratoria en la que los equivalentes reductores entran a través de la succinato deshidrogenasa (vía FAD/FADH₂) y pasan de las quinonas, mediante los citocromos, a una Fe(III) reductasa (Knight and Blakemore, 1998).

Además, las especies *Aeromonas* spp. producen dos sideróforos con gran afinidad por el hierro que contienen ácido 2,3-dihidroxibenzoico: amonabactina y enterobactina, de las cuales sólo la amonabactina tiene un papel relacionado con la virulencia (Seshadri et al., 2006). Por lo tanto, la adquisición de hierro sería de gran importancia para *A. hydrophila*.

Por otro lado, la secuenciación del genoma predice la existencia de estructuras superficiales como pilis, fimbrias o adhesinas asociadas a la adhesión y colonización de los sustratos (Seshadri et al., 2006).

1.4. Mecanismos microbianos de reducción de Fe(III) a pH neutro

A pH neutro, el hierro férrico aparece en forma de distintos sólidos insolubles. Su reducción bacteriana requiere que se establezca un transporte de electrones entre las células y los minerales de Fe(III). La transferencia electrónica puede llevarse a cabo mediante los tres mecanismos que se muestran de forma esquemática en la figura 6.

Inicialmente, se pensó que el contacto físico entre las bacterias reductoras de Fe(III) y los minerales que lo contenían era una condición necesaria para que se produjese la transferencia electrónica. Hoy en día, está generalizada la idea de que los microorganismos reductores de Fe(III) también emplean agentes quelantes o moléculas que actúan como lanzaderas de electrones para facilitar la reducción de los óxidos férricos.

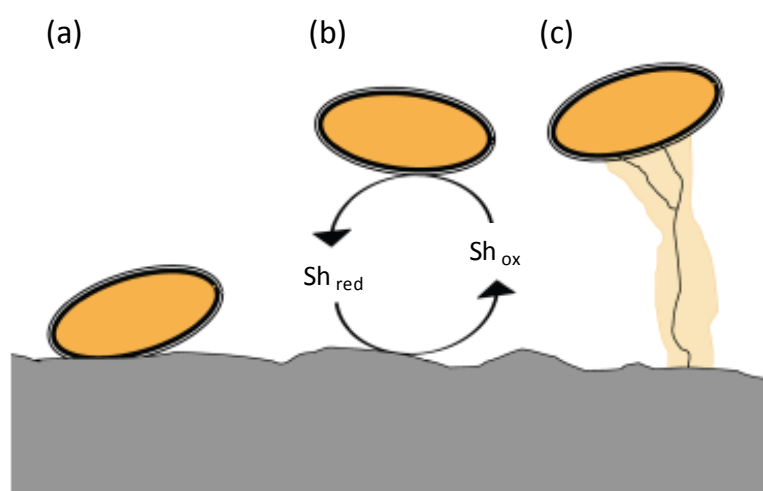


Figura 6. Esquema de los principales mecanismos de transferencia electrónica extracelular utilizados por bacterias reductoras: (a) transferencia electrónica directa, (b) mediante lanzadera de electrones, y (c) mediante una matriz sólida conductora (Torres et al., 2010).

Hay especies de los géneros *Geobacter* y *Shewanella* que necesitan un contacto directo con los minerales de hierro. En el proceso de respiración, el transporte electrónico está asociado con la membrana citoplasmática de las bacterias de manera que los aceptores de electrones solubles, como el oxígeno molecular o el nitrato, entran en la célula mediante difusión pasiva. Sin embargo, a pH neutro, el Fe(III) insoluble no puede difundir hacia el interior celular. Trabajos bioquímicos y estructurales recientes revelan que las proteínas son esenciales para este proceso (Richardson et al., 2012). Se han observado cantidades significativas de citocromos c en la membrana de *Shewanella putrefaciens* y *Geobacter sulfurreducens* cuando las células crecen en condiciones de anaerobiosis (Beliaev et al., 2001; Reardon et al., 2010). Estos citocromos actuarían como transportadores de electrones a través de la membrana, contactarían con los minerales de hierro y podrían donar directamente los electrones.

Como se ha mencionado anteriormente, la baja solubilidad del Fe(III) a pH neutro es el mayor obstáculo para la reducción microbiana. Por este motivo, algunos microorganismos liberan sideróforos, quelantes con gran afinidad por el Fe(III), que facilitan la solubilización y el transporte del hierro dentro de la célula (Luu and Ramsay, 2003). Los sideróforos son producidos por bacterias aerobias o anaerobias facultativas pero no por anaerobias estrictas. Son moléculas solubles en agua y de bajo peso molecular y se inducen a bajas concentraciones de hierro. Generalmente, este mecanismo se da en bacterias con un metabolismo asimilativo del hierro. No obstante, se ha publicado que las especies de *Shewanella* producen un quelante, pero estos estudios aún no han identificado la naturaleza de este compuesto (Gram, 1994).

Además, algunos microorganismos secretarían moléculas implicadas en el proceso de reducción del hierro, las cuales actuarían como lanzadera de electrones (figura 6b). Se han encontrado extracelularmente citocromos tipo c secretados por *Geobacter sulfurreducens* que reducen Fe(III), soluble e insoluble, y transfieren los electrones también entre las bacterias (Seeliger et al., 1998; Seidel et al., 2012).

Shewanella secreta riboflavinas y flavin-mononucleótidos cuando crece en presencia de aceptores de electrones como el hierro, el fumarato y los electrodos de grafito (Bird et al., 2011; Marsili et al., 2008). Las flavinas actúan como lanzaderas de electrones hacia determinados sólidos, como los minerales de Fe(III) o los electrodos. Estas moléculas están en su forma reducida en la superficie celular y se oxidan extracelularmente.

Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales tiene lugar la reducción de Fe(III) en la naturaleza son más complejos ya que están presentes muchos compuestos, tanto propios como externos, que podrían actuar como lanzaderas de electrones y estimular significativamente la reducción de hierro (Straub et al., 2001).

La fuente más común de moléculas lanzadera en el medio ambiente son las sustancias húmicas. Éstas son ubicuas en suelos y sedimentos y su origen está en la degradación de restos vegetales y compuestos producidos durante el metabolismo de organismos presentes en el suelo. Se trata de una mezcla heterogénea de muchos compuestos sin una estructura química definida. Algunos investigadores consideran que se trata de estructuras macromoleculares de composición variable dependiendo de las características del medio en que están solubilizadas, mientras que otros describen las sustancias húmicas como asociaciones moleculares formadas por moléculas “relativamente pequeñas” que están ligadas entre sí por medio de interacciones débiles.

Las sustancias húmicas son muy estables, especialmente en condiciones anaerobias. Se ha demostrado que estas sustancias estimulan la reducción de Fe(III) actuando como moléculas lanzadera entre las células y los sólidos férricos (Kappler et al., 2004; Lovley et al., 1998). En este modelo, las bacterias hierro-reductoras desasimilatorias oxidan los compuestos orgánicos y transfieren los electrones a las sustancias húmicas. Dichas sustancias reducidas pueden ceder posteriormente los electrones de manera abiótica a los minerales de hierro, regenerándose así la forma oxidada de la molécula (Figura 6b).

Algunas bacterias reductoras de Fe(III) han desarrollado otra estrategia con el fin de acceder a los minerales mediante la formación de pilis (Figura 6c). Las especies *Geobacter* son bacterias Fe(III)-reductoras dominantes en muchos ambientes anóxicos y necesitan establecer contacto directo con los óxidos férricos, ya que no producen compuestos lanzadera ni quelantes de hierro. Sin embargo, su capacidad de sintetizar estos filamentos explicaría su predominio al establecerse éstos como una ventaja para competir por el acceso al hierro. *Geobacter metallicus* (Reguera et al., 2005) y *Shewanella oneidensis* (Gorby et al., 2006) son capaces de producir nanohilos conductores mediante los que establecen contacto con los sólidos férricos para reducirlos. Los resultados obtenidos indican que estos “hilos” servirían para transferir los electrones desde la superficie celular hasta la superficie del mineral. Además, se abre la posibilidad de que estos filamentos permitan interacciones entre células, así

como el desarrollo de nuevos materiales conductores en bioingeniería (El-Naggar et al., 2008; Reguera et al., 2006; Torres et al., 2010).

1.4.1. Biopelículas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

Los microorganismos, generalmente, no viven como células aisladas sino que forman bioagregados (móviles) o biopelículas (fijas), es decir, están embebidos en una matriz tridimensional de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que ellos mismos producen y que constituyen su entorno inmediato (Flemming and Wingender, 2010; Neu and Lawrence, 2010).

Las biopelículas se pueden definir basándose en su estructura o en su funcionalidad. En cuanto a sus funciones, pueden encontrarse en el medio ambiente o en instalaciones técnicas donde pueden ser de gran utilidad, como, por ejemplo, en el tratamiento de aguas residuales, o pueden constituir un problema sanitario y/o económico, como en el caso de la biocorrosión.

En base a su estructura, las biopelículas están formadas por los propios microorganismos y sus sustancias poliméricas extracelulares (EPS), asociadas a través de una interfase. Las EPS están compuestas principalmente por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, que confieren estabilidad mecánica a las biopelículas, las cohesionan, facilitan su adhesión a las superficies e interconectan e inmovilizan a las células presentes en las biopelículas (Flemming et al., 2007). Pero las EPS, además de las funciones estructurales, llevan a cabo papeles muy diversos en la biopelícula. Las EPS adsorptivas tienen grupos funcionales cargados, como en las proteínas, polisacáridos o lipopolisacáridos, que intervienen en la adsorción, intercambio y liberación de compuestos disueltos (nutrientes, metales o contaminantes). Las denominadas EPS activas son mayoritariamente enzimas que intervienen en la degradación de compuestos orgánicos. Los ácidos nucleicos y las lectinas son EPS que permiten intercambiar información y regular diferentes procesos como la actividad enzimática. Las EPS pueden actuar como reserva de nutrientes o permitir la movilidad de los microorganismos. Y, aunque hay muy pocas evidencias, parece que algunas EPS

podieran jugar un papel redox de forma que podrían ser usadas por algunas bacterias en la respiración anaerobia.

Las EPS pueden subdividirse en dos fracciones: EPS capsular y EPS coloidal (Figura 7). La fracción de la EPS capsular está íntimamente unida a las células, mientras que la EPS coloidal está débilmente ligada a tales células o disuelta en el medio. Generalmente, estas dos fracciones de EPS pueden separarse por centrifugación: la fracción coloidal permanece en el sobrenadante mientras que la fracción capsular queda en el pellet de microorganismos. La estructura de las EPS capsular está formada por dos capas: una interna fuertemente unida a las células y la más externa que se encuentra más dispersa.

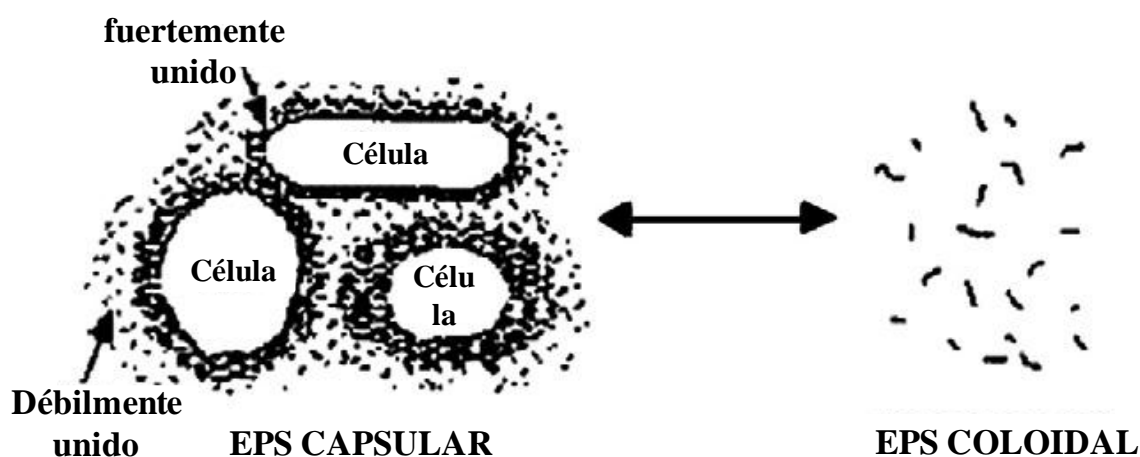


Figura 7. Esquema de la estructura de las EPS (Sheng et al., 2010)

Las EPS están compuestas por una gran variedad de constituyentes y todavía su purificación y análisis químico es un reto. No hay un método universal para la extracción de las EPS y el procedimiento de extracción debe adaptarse específicamente al tipo de biopelícula que es objeto de la investigación. Se han descrito métodos que emplean la centrifugación (Gerbersdorf et al., 2009), el calentamiento, la filtración, la sonicación (Bourven et al., 2011), y el tratamiento con agentes complejantes y con resinas de intercambio iónico (Shen et al., 2012). También se ha usado el hidróxido sódico (Alasonati and Slaveykova, 2012), aunque este último método conlleva la contaminación de las EPS con componentes del citoplasma. El método de extracción

ideal debería ser efectivo, causar la mínima lisis celular y no romper la estructura de las EPS. La eficiencia de su extracción difiere significativamente según el método de extracción utilizado. Además, ninguno de los métodos puede extraer la totalidad de las EPS producidas por los microorganismos.

La investigación que se ha llevado a cabo en las últimas décadas se ha centrado en estudiar las propiedades de estos biopolímeros. Las técnicas analíticas utilizadas para el estudio de los componentes de las EPS se pueden clasificar en dos grupos: no destructivas y aquellas otras que estudian las EPS extraídas de las biopelículas.

La determinación de la composición de la matriz de las EPS en biopelículas y agregados es compleja. Los análisis químicos colorimétricos convencionales pueden utilizarse para cuantificar el contenido en este tipo de sustancias. Por ejemplo, el contenido en carbohidratos se puede medir con el método de la antrona (Trevelyan et al., 1952) o el del fenol-sulfúrico (DuBois et al., 1956), y las proteínas con el método de Lowry (Lowry et al., 1951) o con el de Bradford (Bradford, 1976).

La microscopía láser confocal de barrido (*Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM*) es la técnica no destructiva más popular (Neu and Lawrence, 1997; Zippel and Neu, 2011) y se emplea para analizar varios componentes de las EPS en las biopelículas. Los distintos componentes se pueden identificar visualmente mediante la adición de tinciones fluorescentes. Por ejemplo, los polisacáridos se localizan usando lectinas conjugadas con marcadores fluorescentes y los ácidos nucleicos se pueden observar con marcadores específicos. La técnica CLSM ha jugado un papel importante en el conocimiento de la distribución espacial y de la formación de microdominios en las biopelículas.

La espectroscopia infrarroja mediante transformada de Fourier (*Fourier-transformed infrared, FTIR*) es otra técnica que puede ser no destructiva o que puede utilizarse para las EPS extraídas. FTIR proporciona información útil sobre los grupos funcionales de los componentes de las EPS que generalmente tienen un papel adhesivo y cohesivo en las biopelículas (Karunakaran and Biggs, 2011; Sheng et al., 2006).

El enorme potencial de la tecnología de las biopelículas en la industria, su ubicuidad en infecciones y enfermedades y la complejidad de su estudio han atraído el interés de la

comunidad científica. Actualmente, la investigación se centra en el papel de los exopolímeros en la formación de estas biopelículas, así como en su influencia en el medioambiente, en las propiedades de los sustratos o en el control molecular de la producción de las películas. Es un campo multidisciplinar en el que la cooperación entre investigadores de distintas áreas es fundamental para alcanzar un conocimiento en profundidad que permita su control y aplicación.

1.4.2. Comunicación entre bacterias: *quorum sensing*

La comunicación es, por definición, un proceso de intercambio de información (señales) entre un emisor y un receptor a través de un medio común. La comunidad científica ha descubierto la capacidad de las bacterias de una biopelícula para comunicarse unas con otras. Estas comunicaciones conducen a un aumento de la formación de biopelículas en un esfuerzo cooperativo entre poblaciones bacterianas.

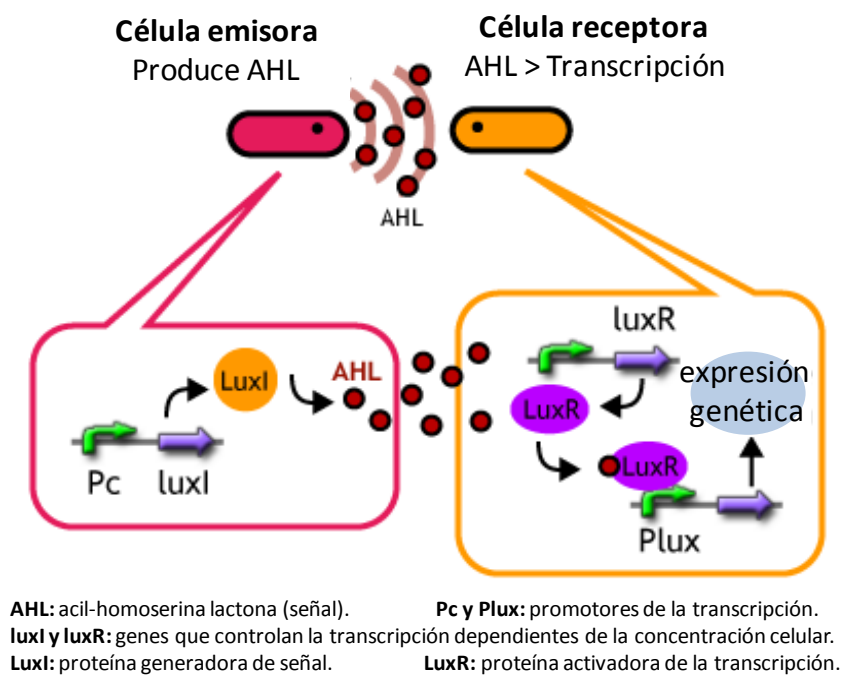


Figura 8. Esquema del sistema de *quorum sensing* en *Vibrio fischeri*.

Quorum sensing (QS) es un mecanismo que permite a los microorganismos comunicarse químicamente a través de moléculas-señal, denominadas autoinductores,

para inducir la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular (Waters and Bassler, 2005).

El sistema QS de *Vibrio fischeri* fue el primero en ser descrito y es un buen ejemplo general del fenómeno (Schaefer et al., 1996) (Figura 8). En esta bacteria, la enzima LuxI es la responsable de la síntesis de pequeñas moléculas o autoinductores que difunden fuera de la célula. Cuando la concentración de autoinductor alcanza un cierto valor umbral en el medio, es posible que la molécula vuelva a difundir al interior celular e interactúe con el regulador transcripcional LuxR iniciándose así la expresión de genes (Nasser and Reverchon, 2007).

Las bacterias utilizan una gran variedad de moléculas autoinductoras. Las Gram-positivas utilizan oligopéptidos (Lyon and Novick, 2004); las acil-homoserin lactonas (AHLs) son las señales más comunes en la comunicación entre células en las Gram-negativas (Fuqua et al., 1994); y las moléculas AI-2, derivadas de *S*-4,5-dihidroxi-2,3-pentanonodiona, se consideran las moléculas de señalización universal utilizadas para la comunicación entre especies (Vendeville et al., 2005).

Las acil-homoserina-lactonas (AHL) son el tipo principal de autoinductores empleados por las *Proteobacterias* para el *quorum sensing* entre células de la misma especie. Las AHL están compuestas por anillos de homoserina-lactona que contienen cadenas acilo con longitudes comprendidas entre 4 y 18 átomos de carbono (Figura 9). Estas cadenas laterales pueden sufrir modificaciones de vez en cuando, sobre todo en la posición C3 o con la presencia de dobles enlaces insaturados.

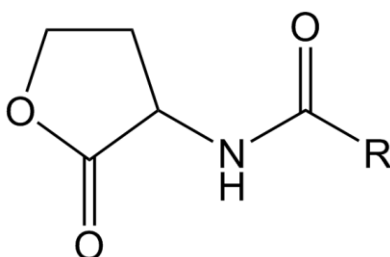


Figura 9. Estructura de la *N*-acil-homoserina lactona.

El sistema de *quorum sensing* permite controlar varios procesos entre bacterias que incluyen la competencia, la bioluminiscencia, la virulencia, la formación de biopelículas y la esporulación (Ng and Bassler, 2009). Se ha demostrado que en algunas bacterias Gram-negativas la producción de las EPS y la formación de biopelículas están reguladas por el mecanismo de QS (Decho et al., 2011; Labbate et al., 2007).

Como ya se ha mencionado anteriormente, las bacterias tienden a adherirse y crecer en los medios naturales sobre distintas superficies formando biopelículas en lugar de aparecer como células planctónicas. Las ventajas de que las bacterias crezcan formando biopelículas son múltiples; entre otras, el poder disponer de nutrientes suministrados por otras bacterias que crecen a su alrededor y la defensa frente a otros microorganismos o agentes antimicrobianos. Al mismo tiempo, hay evidencias de que los procesos relacionados con la formación de biopelículas están regulados por sistemas de *quorum sensing* (Marquina and Santos de la Sen, 2010). Puesto que las AHLs son señales de regulación global para las actividades bacterianas, no sólo afectarán a la composición de la biopelícula sino también a los procesos derivados de su existencia, como el bioensuciamiento, la fijación de nitrógeno, la reducción de sulfato o la degradación de materia orgánica (Huang et al., 2009). Se ha establecido que las etapas del desarrollo de una biopelícula son las siguientes:

Adhesión a la superficie: los microorganismos, tras localizar la superficie donde se van a depositar, desarrollan distintas estrategias para su unión a la misma. En el caso de las bacterias Gram-negativas, las fimbrias y los flagelos juegan un papel muy importante en la adhesión a los sustratos, aunque no son fundamentales para conseguir su unión a los mismos.

División celular y formación de colonias: una vez que las bacterias han conseguido adherirse al soporte, en el caso de poseer flagelos los pierden y comienzan a dividirse hasta formar microcolonias. Este proceso es muy importante pues, cuando se alcanza una concentración celular límite, la concentración de moléculas autoinductoras liberadas al medio extracelular alcanza el nivel umbral y se establece la regulación de la formación de la biopelícula mediante *quorum sensing*.

Secreción de sustancias poliméricas extracelulares: en las circunstancias anteriores, los microorganismos que forman la biopelícula empiezan a secretar las EPS, que van a

constituir la matriz de la biopelícula. La regulación del proceso de producción y secreción están controlados por *quorum sensing*.

Maduración y salida de células para formar una nueva biopelícula: una vez que la biopelícula ha alcanzado un espesor determinado, se produce la diferenciación de las células de la zona apical de forma que éstas células se desprenden de la matriz de exopolímeros; si son flageladas comienzan a moverse y migran hasta alcanzar un nuevo soporte al que se adhieren comenzando nuevamente el proceso.

En consecuencia, las moléculas de AHL sintéticas y análogos de AHL podrían utilizarse para favorecer o inhibir los fenotipos regulados mediante QS (Galloway et al., 2011; González et al., 2013; Stevens et al., 2011), lo que podría dar lugar a futuras aplicaciones en campos tan diferentes como la biominería, la medicina o la producción de energía.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. Objetivos

El procesamiento de menas minerales para la obtención de metales mediante tecnologías convencionales conlleva unos gastos considerables de energía y reactivos que además son perjudiciales para el medio ambiente. Actualmente, hay un interés creciente en la investigación de tratamientos ecológicos y sostenibles, tanto por los posibles riesgos medioambientales, acrecentados por una legislación cada vez más restrictiva, como por un interés económico e industrial. En este contexto, el papel de algunos microorganismos en la disolución de minerales convierte a la biolixiviación en una alternativa para la obtención de distintos metales. Los avances recientes en campos como la biología molecular, el análisis químico, la ciencia de superficies o la nanotecnología, han contribuido a mejorar la comprensión de este bioproceso.

La biolixiviación, tradicionalmente, se ha asociado a bacterias oxidantes del Fe(II). Sin embargo, los microorganismos que oxidan materia orgánica asociada a la reducción de Fe(III) o Mn(IV), como únicos aceptores de electrones, han sido descubiertos en décadas recientes y, en consecuencia, el conocimiento sobre ellos y su metabolismo del hierro es escaso. Las transformaciones redox del hierro se encuentran entre las reacciones biogeoquímicas más importantes en sedimentos acuáticos y suelos, juegan un papel fundamental en la oxidación tanto de materia orgánica natural como de distintos contaminantes y participan en fenómenos de movilización de metales y nutrientes. Desde el punto de vista tecnológico, estas bacterias ofrecen la posibilidad de reducir minerales férricos, como las jarositas que se generan como residuos de otros procesos de obtención o que aparecen en el medio ambiente, y que pueden ser consideradas una fuente interesante para la recuperación de los metales valiosos contenidos.

Uno de los principales interrogantes del proceso de biorreducción son los mecanismos por los que se establece la transferencia de electrones entre los organismos procariotas y los minerales de hierro. En este punto, la identificación de compuestos quelantes de Fe(III) y de moléculas que actúan como lanzaderas de electrones producidas por los microorganismos es clave para comprender la importancia biológica y ecológica de los mecanismos postulados.

También una mejor comprensión de cómo la comunicación entre los microorganismos cambia el comportamiento de las poblaciones bacterianas e influye en la formación de biopelículas podría tener importantes consecuencias en biotecnología e implementarse en nuevas aplicaciones como la producción de energía mediante pilas de combustible microbianas, o generar la posibilidad de desarrollar nuevos materiales en otros campos como la nanotecnología.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, el **objetivo principal** de la presente Tesis Doctoral se ha centrado en el **estudio de la reducción bacteriana del ion férrico y en la capacidad de los cultivos ensayados para mantener el hierro en disolución**; así como en **la investigación de los distintos mecanismos microbianos involucrados en la reducción del metal y en la interacción entre las superficies de los sólidos y las bacterias**. Este objetivo principal se abordó a través del planteamiento de unos objetivos más específicos:

- **Aislamiento de cultivos bacterianos reductores de hierro.** Se realizaron muestreos en una zona minera con el fin de encontrar microorganismos capaces de reducir hierro en condiciones de anaerobiosis pero que tolerasen pequeñas concentraciones de oxígeno. De esta forma sería mayor la posibilidad de implementarlos en aplicaciones biotecnológicas.
- **Estudio de la reducción de sólidos férricos** por los distintos cultivos bacterianos reductores de hierro con el objetivo de determinar su potencial aplicación en procesos biohidrometalúrgicos que pudieran en el futuro sustituir a los tradicionales pirometalúrgicos.
- **Estudio de la influencia de las sustancias húmicas y de los agentes quelantes en el proceso de biorreducción.** El potencial de las sustancias húmicas para actuar como aceptores de electrones en la respiración microbiana y su función como lanzaderas de electrones entre las bacterias reductoras de hierro, así como la capacidad de los compuestos quelantes de mantener el hierro en solución, podrían favorecer la biorreducción del hierro y la recuperación del metal.
- **Extracción y caracterización de las sustancias poliméricas extracelulares.** La determinación de la composición de las EPS permitiría identificar sus grupos

funcionales más representativos y conocer su papel en el proceso de biorreducción del hierro.

- **Caracterización de nanohilos conductores.** Los filamentos producidos por *A. hydrophila* sobre distintas superficies se caracterizaron mediante diferentes técnicas de microscopía, con el objetivo de estudiar la influencia de la naturaleza del soporte en el desarrollo de los filamentos, la composición de éstos y sus propiedades. Además, se estudió cómo el mecanismo de *quorum sensing* repercute en el desarrollo de los nanohilos.
- **Estudio de las biopelículas bacterianas formadas sobre los minerales.** El propósito de este objetivo específico fue caracterizar la distribución de las células y de los glicoconjugados en la biopelícula para elucidar su función en el proceso de biorreducción.

2.2. Plan de trabajo

Para poder cubrir los objetivos anteriormente planteados, se trabajó de acuerdo con la siguiente planificación de la investigación:

- 1) En primer lugar, se hizo un muestreo en campo a partir del cual se aislaron e identificaron distintos cultivos bacterianos. Se seleccionaron las cepas con las que se realizó el trabajo de investigación y se cultivaron en anaerobiosis con una fuente de hierro soluble. Estos cultivos se caracterizaron mediante la cuantificación de su población y la medición de la concentración de ion ferroso, acidez y potencial redox.
- 2) A continuación, se realizó la selección y síntesis de los diferentes sólidos férricos para ser utilizados en los ensayos de biorreducción. El estudio se centró en la reducción de jarositas, tanto sintéticas como de minerales naturales procedentes de Río Tinto (Huelva). Estos sólidos se caracterizaron químicamente mediante difracción de rayos X (XRD).

- 3) Una vez seleccionados los minerales, se estudió la capacidad de reducción de Fe(III) y lixiviación de los minerales por los diferentes cultivos bacterianos. Además, los productos de reacción se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y se caracterizaron mediante XRD.
- 4) Se estudió la influencia de las sustancias húmicas, ubicuas en los ambientes naturales, mediante el uso de un análogo sintético, y se evaluó su efecto, como aceptores de electrones, en el proceso de la respiración bacteriana y como lanzadera de electrones, entre las células y los sólidos férricos. También se analizó el efecto de algunos de los quelantes más frecuentes en el proceso de biorreducción de jarositas.
- 5) Se estudió la influencia de diferentes soportes sólidos sobre la formación y el crecimiento de biopelículas microbianas. Las biopelículas, se analizaron mediante distintas técnicas de microscopia: SEM, AFM y CLSM.
- 6) Posteriormente, se realizó una extracción de las EPS de las cepas puras crecidas en diferentes condiciones (Fe soluble, Fe soluble en presencia de soporte y Fe mineral) utilizando EDTA. Tras la purificación de las EPS, se cuantificó su producción por la célula y se determinó su contenido en carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y ácidos urónicos. Asimismo, se cuantificó la lisis celular mediante la medida de KDO, un componente de la membrana celular de las bacterias Gran-negativas. Adicionalmente, las EPS se caracterizaron utilizando espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).
- 7) Las biopelículas formadas sobre el mineral natural de gossan de la mina de Río Tinto, se analizaron mediante CLSM. Para ello, se realizaron tinciones fluorescentes específicas para ácidos nucleicos y se emplearon 10 lectinas conjugadas, que se unen específicamente a determinados grupos funcionales presentes en los exopolisacáridos.
- 8) Se caracterizaron los nanohilos producidos por *A. hydrophila*. Se estudió la influencia de los soportes en la adhesión celular y en la formación de nanohilos. La morfología se observó mediante SEM y AFM, las propiedades eléctricas se analizaron mediante AFM y su naturaleza se estudió a través de la extracción y la purificación de las proteínas.

- 9) Finalmente, se evaluó la posibilidad de controlar la expresión de los nanohilos de *A. hydrophila* a través del mecanismo de *quorum sensing* utilizando diferentes acil homoserin-lactonas (AHLs).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestreo de campo

La toma de muestras se realizó en enero de 2008 en la Sierra de Cartagena-La Unión en una corta de mina, la corta Brunita, en las proximidades de La Unión. La localización exacta de la zona de muestreo se indica en el mapa de la figura 10.

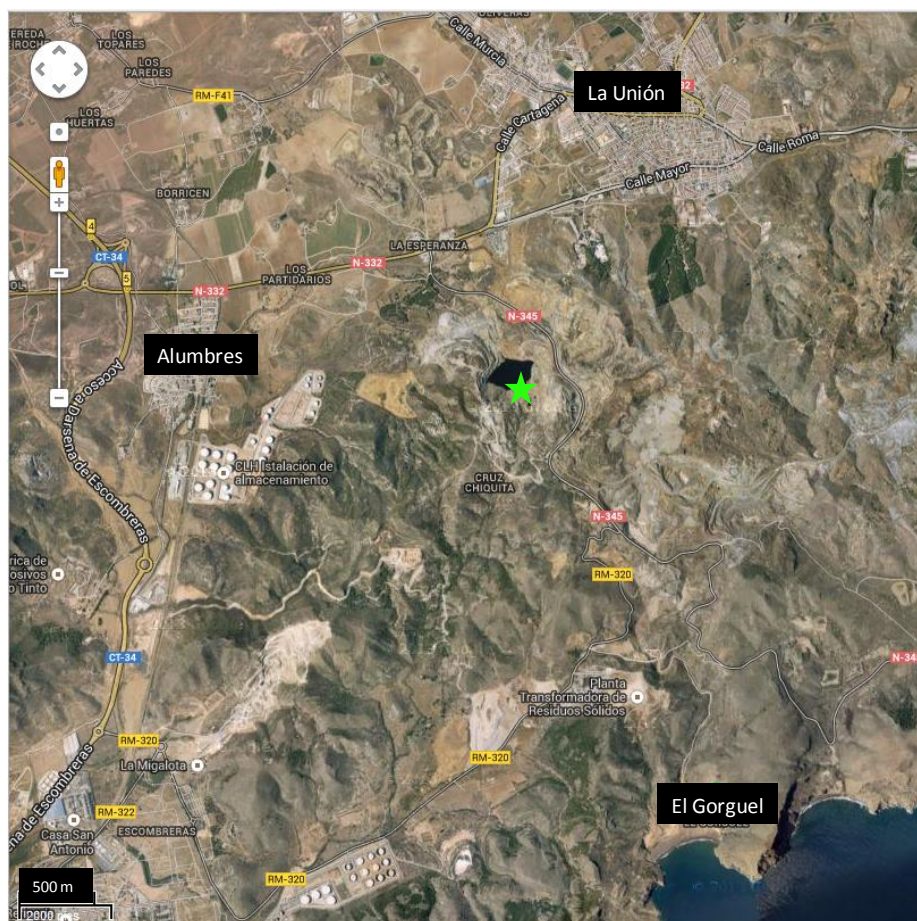


Figura 10. Situación geográfica del lugar de muestreo en el distrito minero de Cartagena-La Unión (Murcia). Corta Brunita (★).

En la Sierra de Cartagena-La Unión se vienen desarrollando actividades mineras, con mayor o menor intensidad, desde hace más de 2.500 años. La principal zona minera, caracterizada por acumulaciones de Zn-Pb, ocupa aproximadamente un área de 50 km² y se localiza en la parte central de dicha sierra. No obstante, la presión económica, social y medioambiental hizo que la actividad extractiva cesara, de manera casi total, en 1991 (Robles-Arenas et al., 2006).

Históricamente, se han contabilizado diferentes excavaciones mineras (12 cortas y unos 3.000 pozos y galerías), que han generado más de 2.000 acumulaciones de residuos minero-metalúrgicos (Robles-Arenas, 2007). Estas excavaciones mineras y las acumulaciones de residuos y estériles han eliminado casi por completo el suelo natural, con el enorme impacto ambiental que ello conlleva. Muy probablemente, la erosión de estas acumulaciones ha favorecido la movilización de importantes cantidades de material, así como la entrada de elementos ecotóxicos presentes en la mineralización de los ecosistemas previamente existentes. Por otro lado, el transporte eólico puede haber favorecido un incremento importante de las concentraciones de metales en suelos de zonas no afectadas directamente por el drenaje superficial.

La corta Brunita tiene como origen las actividades mineras subterráneas realizadas en la década de 1950 y los bombeos realizados para evitar su inundación. El cierre de la corta trajo consigo el cese del bombeo que dio lugar a un lago interior artificial con un volumen de 622.000 m³ (Figura 11a). Según estudios previos (Robles-Arenas, 2007), el lago contiene mayoritariamente sulfato de magnesio y presenta pH ácido.

El pH del agua del lago que se midió in-situ, con papel pH, fue de aproximadamente 3-3,2. En esta zona, se tomaron un total de 5 muestras sólidas que fueron resuspendidas en agua estéril e inmediatamente inoculadas en una serie de frascos que contenían diferentes medios nutrientes en condiciones estériles. La localización de esas 5 muestras se refleja en la figura 11 y corresponden a:

- Dos muestras sólidas tomadas del propio lago, en la zona próxima a la orilla y a una cierta profundidad, y separadas entre sí varios metros, que se corresponden con los números 1 y 2 de la figura 11a, respectivamente.
- Tres muestras en la zona seca próxima al lago, que se corresponden con los números 3, 4 y 5 de las figuras 11a y 11b, respectivamente.



Figura 11. Localización de las cinco zonas de muestreo en la corta Brunita.

3.2. Caracterización del consorcio bacteriano

El consorcio natural se estudió mediante una amplificación de fragmentos de genes ribosomales (PCR) y, posteriormente, se hizo migrar a los fragmentos generados en un gel con un gradiente creciente desnaturante (DGGE). Los fragmentos de genes 16S rRNA se secuenciaron tanto para bacterias como para archeas. El estudio de las huellas se llevó a cabo en el Centro Biotecnológico de la Universidad Católica del Norte (Antofagasta, Chile) (Demergasso et al., 2005).

3.3. Aislamiento e identificación de bacterias reductoras de hierro

Se aisló un cultivo puro de *A. hydrophila* tras diez transferencias sucesivas, con un 10% de inóculo de un cultivo activo de bacterias Fe(III)-reductoras. El aislado se obtuvo mediante el crecimiento de colonias en placas de agar (20 g/l de agar) preparadas con un medio Postgate C al que se le añadió citrato férrico (60 mM de Fe^{3+}). Las placas se incubaron en condiciones anaerobias a 30 ± 2 °C en una jarra de anaerobiosis (*GENbox bioMérieux*) (Figura 12). Las colonias individuales se dispersaron en frascos de 10 ml que contenían medio Postgate C con citrato férrico soluble como fuente de hierro. El aislado obtenido se envió a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT,

Universidad de Valencia, España) para su depósito. La identificación se realizó siguiendo la metodología descrita por Arahal (Arahal et al., 2008). Posteriormente, este aislado se depositó en la CECT como *Aeromonas hydrophila* A.



Figura 12. Modelo de jarra anaerobia empleada para el crecimiento de los microorganismos en placa. Cultivos tras 4 días de incubación.

3.4. Crecimiento de cultivos bacterianos

Para llevar a cabo los procedimientos de aislamiento y enriquecimiento se utilizaron técnicas estándar de anaerobiosis. Éstas también se emplearon en el cultivo de *S. putrefaciens*. Se emplearon viales cerrados con tapones de goma gruesos y las transferencias se realizaron con jeringuillas y agujas. Las trazas de oxígeno se eliminaron de las jeringuillas haciendo pasar una corriente de gas anóxico: N_2/CO_2 (80/20, v/v).

El medio de cultivo se preparó dispensando el medio aerobio en frascos individuales y burbujeándolo vigorosamente con una corriente de gas anóxico, para eliminar el oxígeno del medio, durante 10 min (Lovley and Phillips, 1986a). Los viales se sellaron con anillas de aluminio para mantener la anaerobiosis.

El medio de cultivo fue el medio Postgate C modificado cuya composición se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Componentes del medio Postgate C modificado.

Sales	Concentración / g·l ⁻¹
Dihidrógeno fosfato de potasio, KH ₂ PO ₄	0,5
Cloruro de amonio, NH ₄ Cl	1,0
Sulfato de sodio, Na ₂ SO ₄	4,5
Cloruro de calcio, CaCl ₂ ·H ₂ O	0,04
Sulfato de magnesio, MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,06
Extracto de levadura	1,0
Citrato de sodio	0,22

La fuente de carbono utilizada fue lactato de sodio en una concentración de 6 g/l. El pH del medio se ajustó al valor deseado, pH ~ 6, y se esterilizó en una autoclave a 121 °C, durante 30 minutos.

Los cultivos se inocularon con un 10% de un cultivo activo y se incubaron sin agitación, a 30 °C y en la oscuridad.

3.5. Fuentes de ion férrico

3.5.1. Citrato férrico como fuente de hierro soluble

Previamente a la adición de cualquier componente del medio, se calentaron 800 ml de agua desionizada sobre una placa con agitación magnética hasta alcanzar una temperatura próxima a su punto de ebullición. A continuación, se añadió el citrato férrico de forma que la concentración final de Fe(III) fuera 60 mM e inmediatamente se tapó el recipiente para no exponer la disolución a la luz solar y prevenir la fotorreducción del Fe(III). Un vez que el citrato férrico se había disuelto, se enfrió bruscamente, en un baño de hielo, hasta alcanzar la temperatura ambiente. El pH se ajustó a 6,0 con NaOH 10 N. Finalmente, se añadieron los componentes del medio descritos en el apartado anterior y se llevó a un volumen final de 1 litro.

3.5.2. Síntesis de jarositas de amonio y potasio

La síntesis de jarosita se realizó utilizando un cultivo de *Sulfolobus metallicus*. *S. metallicus* es una archaea acidófila y quimiolitotrofa. Estos microorganismos son hierro-oxidantes y generan jarositas de amonio de buenas características estructurales, entre otros motivos, por la temperatura a la que crecen, es decir, unos 70 °C. Los cultivos crecieron en el medio 9K propuesto por Silverman y Lungrend (Silverman and Lundgren, 1959). Este medio se preparó según las concentraciones descritas en la tabla 4, ajustando el pH a 1,7 con H₂SO₄.

Tabla 4. Componentes del medio 9K

Sales	Concentración / g·l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
KCl	0,1
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0,01
FeSO ₄ · 7H ₂ O	50

Como ya se ha comentado, los microorganismos se cultivaron en este medio a 70 °C durante un periodo de 7 días. La jarosita se separó dejando decantar la solución y filtrando el precipitado a vacío. El precipitado se lavó con agua desionizada y se dejó secar a temperatura ambiente. Se guardó después en un lugar seco.

El análisis por difracción de rayos X reveló que se trataba de una mezcla de dos jarositas, de amonio y de potasio, cuyas fórmulas químicas son (NH₄)Fe₃(SO₄)₂(OH)₆ y KFe₃(SO₄)₂(OH)₆, respectivamente.



Figura 13. Síntesis de jarositas con la ayuda de un cultivo de *S. metallicus*.

3.5.3. Síntesis de argentojarosita

La argentojarosita utilizada en este estudio se sintetizó químicamente mediante el método propuesto por May (May et al., 1973). De acuerdo con este procedimiento, se añadieron 3,27 g de Ag_2SO_4 a 430 ml de agua Milli Q en ebullición, seguido de la adición de 5,7 ml de H_2SO_4 17,6 N y 60 ml de una disolución 0,5 M de Fe_2SO_4 . La mezcla se agitó a 95 °C durante 200 h en un matraz acoplado a un condensador. El producto final se lavó con agua desionizada.

3.5.4. Gossan procedente de Río Tinto: un mineral natural

El gossan usado en la experimentación fue una muestra representativa del gossan de la mina de Río Tinto utilizada en 1991 en una planta de cianuración y suministrada por Río Tinto Minera S.A. a la Universidad de Barcelona (Departamento de Ciencia de Materiales). La muestra se empleó en las mismas condiciones en las que se trataba mediante cianuración, es decir, molida con el 65% de las partículas con un tamaño inferior a 40 μm . La composición del mineral de gossan se muestra en la tabla 5 (Viñals et al., 1995).

Tabla 5. Análisis químico de la muestra de mineral gossan de la mina de Río Tinto.

Componente	Porcentaje
Fe	28,9
SiO₂	43,8
Pb	1,55
As	0,67
K	0,07
S*	0,51
Sb	0,11
Cu	0,061
Zn	0,021
Hg**	14
Ag**	41
Au**	1,0

*Total de azufre excluyendo barita; **en g/t

3.6. Extracción de EPS con EDTA

El método seleccionado para la extracción de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) fue el procedimiento químico que utiliza ácido etilendiaminotetraacético dihidratado (EDTA). Este método fue aplicado a la extracción de las EPS de cultivos de las cepas *A. hydrophila* y *S. putrefasciens*. El protocolo de extracción se presenta en la figura 14. Cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento, se centrifugaron a 7.500 rpm (9.900 g) y 4 °C, durante 10 minutos. El sobrenadante se recolectó y se filtró en condiciones de esterilidad con un filtro de 0,22 µm con el fin de eliminar las bacterias residuales. Esta fue la fracción coloidal de las EPS.

Con el fin de extraer la fracción capsular, el pellet se resuspendió en 10 ml de solución salina y se centrifugó a 7.500 rpm (9.900 g) y 4 °C, durante 10 minutos. El sobrenadante, recogido y filtrado en las mismas condiciones indicadas anteriormente, constituyó la fracción lavada. A continuación, el pellet resultante se resuspendió en 10

ml de una disolución de la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético dihidratada (EDTA), a pH 7. La suspensión se incubó con agitación durante una hora a 4 °C. Posteriormente, la mezcla resultante se centrifugó a 7.500 rpm (9.900 g) y 4 °C durante 10 minutos y el sobrenadante se filtró. Este proceso se repitió tres veces y las tres fracciones obtenidas constituyeron la fracción capsular.

Con el fin de eliminar las sales residuales del medio de cultivo y el agente extractante, cada fracción de las EPS fue dializada, primero, frente a agua desionizada durante 12 horas y, después, frente a agua Milli Q, durante 72 horas a 4 °C, cambiada por agua *milliQ* fresca cada 8 horas, aproximadamente. Para llevar a cabo la diálisis, se utilizó una membrana tubular de celulosa regenerada de 3.500 Da.

La masa de las EPS purificadas se determinó mediante la liofilización de 2 ml de las fracciones de las EPS obtenidas. La liofilización se realizó con un equipo ALPHA 2-4 LSC a 1 mbar y -80 °C, durante 24 h.

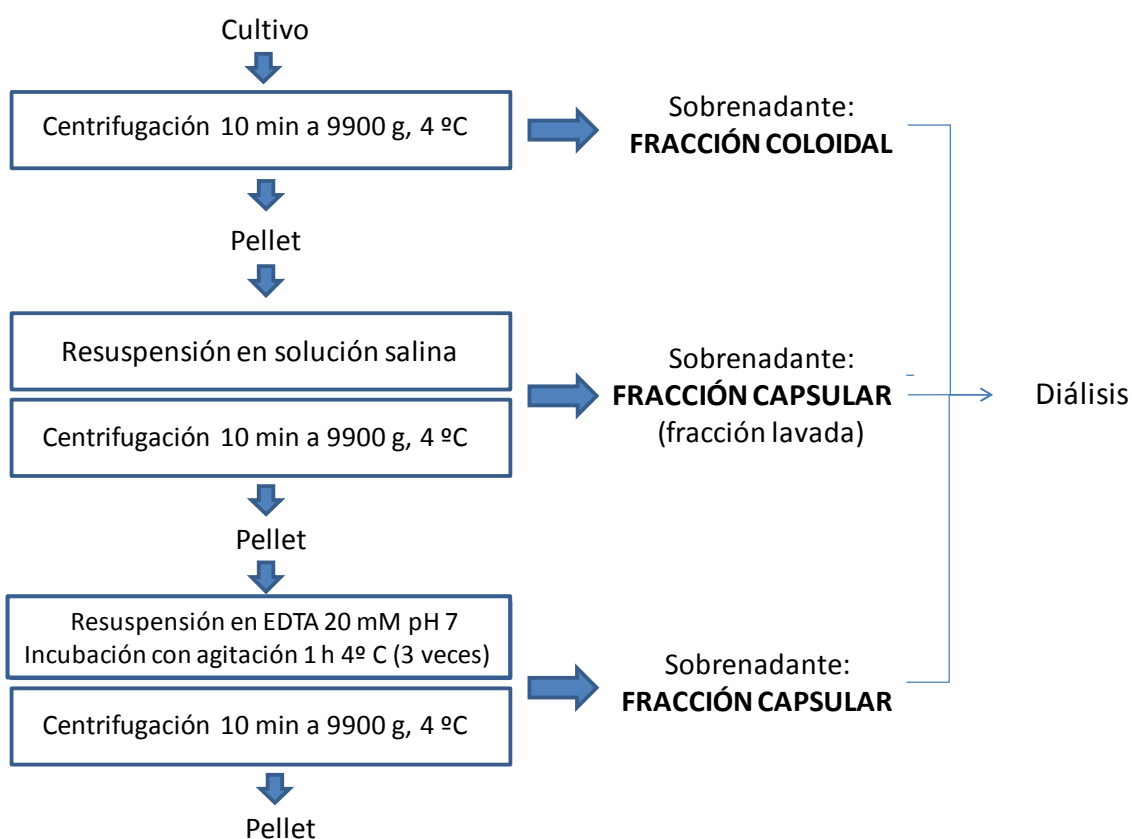


Figura 14. Esquema general del método empleado para la extracción de las EPS.

3.7. Caracterización química de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

La composición química de las EPS extraídas de los cultivos puros, se analizó mediante métodos colorimétricos convencionales. También, se evaluó la efectividad del método de extracción mediante la cuantificación de la lisis celular durante el proceso. Para llevar a cabo las medidas se utilizó un espectrofotómetro de UV-Vis JASCO V-650.

3.7.1. Análisis de carbohidratos

Los carbohidratos se determinaron mediante el método de DuBois (DuBois et al., 1956). El patrón utilizado fue glucosa. Para llevar a cabo el ensayo, se agregaron 2,5 ml de ácido sulfúrico y 0,5 ml de una disolución al 5% de fenol a 0,5 ml de muestra y se agitó tras cada adición. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y, posteriormente, se incubó a 30 °C, en un baño termostático, durante 15 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia de la disolución resultante a 490 nm.

3.7.2. Análisis de proteínas

El contenido de proteínas se determinó usando el método de Lowry (Lowry et al., 1951) utilizando albúmina de suero de bovino (BSA) como patrón. El procedimiento consistió en agregar 1,0 ml de la muestra a 1,0 ml de reactivo de Lowry, manteniendo la mezcla estática durante 20 minutos, y añadiendo, a continuación, 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu. Al cabo de 30 minutos, se midió la absorbancia de la mezcla a 595 nm.

3.7.3. Análisis de ácidos urónicos

La cuantificación de ácidos urónicos se realizó mediante el método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973), utilizando ácido D(+)-glucurónico como patrón. El procedimiento consistió en agregar 0,2 ml de muestra a 1,2 ml de una disolución 0,0125 M de tetraborato sódico en ácido sulfúrico concentrado. A continuación, los tubos se refrigeraron en un baño de hielo, se agitaron en un vortex y se calentaron en un baño de agua a 100 °C durante 5 minutos. Los tubos se enfriaron en un baño de hielo y se añadieron 20 µl de una disolución de *m*-hidroxidifenilo (0,15% de *m*-

hidroxidifenilo en 0,5% de NaOH). La mezcla se agitó y, después de 5 minutos, se midió la absorbancia a 520 nm.

3.7.4. Análisis de ácidos nucleicos

El contenido en ácidos nucleicos se determinó utilizando el método de Burton (Burton, 1956). El patrón empleado fue ADN de esperma de salmón. Los patrones de distintas concentraciones y las muestras se diluyeron con HClO_4 0,5 N y se mezclaron con 2 volúmenes de una disolución de difenilamina con acetaldehído. Esta disolución se preparó añadiendo 1,5 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético y 1,5 ml de H_2SO_4 concentrado. Este reactivo se almacenó en ausencia de luz y en el mismo día de uso se añadieron 0,10 ml de acetaldehído por cada 20 ml de reactivo requerido.

El color en las muestras se desarrolló tras incubarlas a 30 °C, durante 20 horas, y se midió la absorbancia a 600 nm.

3.7.5. Análisis de la lisis celular

La contaminación de las EPS con compuestos procedentes de la lisis celular durante el proceso de extracción se estimó analizando la cantidad de 2-ceto-3-deoxioctonato (KDO) en las muestras, usando KDO como patrón (Karkhanis et al., 1978).

Para ello, se añadió a la muestra 1 ml de H_2SO_4 0,2 N. La mezcla se calentó a 100 °C durante 30 minutos, se enfrió, se centrifugó la mezcla a 10000 rpm durante 5 minutos y se tomaron 0,5 ml de sobrenadante que se pusieron en otro tubo. A este nuevo tubo se le añadieron 0,25 ml de HIO_4 0,04 M en H_2SO_4 0,125N, se agitó y se dejó 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 0,25 ml de NaAsO_2 al 2,6% en HCl 0,5 N, se agitó y se esperó a que el color marrón desapareciese. Seguidamente se añadieron 0,5 ml de TBA al 0,6%, se agitó y se calentó el tubo a 100 °C durante 15 minutos. Finalmente, se añadió 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) cuando todavía estaba caliente y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 550 nm.

3.8. Obtención de proteínas extracelulares

Algunas proteínas de las EPS extraídas de *A. hydrophila* se purificaron y se identificaron mediante métodos de proteómica para determinar su estructura y función en la biopelícula.

3.8.1. Precipitación de proteínas

Las proteínas extracelulares se obtuvieron mediante precipitación en condiciones ácidas usando ácido tricloroacético, TCA (Sambrook et al., 1989). Se agregó TCA al 100%, frío, a la disolución con las proteínas hasta una concentración final de TCA del 10%. La mezcla resultante se agitó, se conservó toda la noche a 4 °C y, posteriormente, se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a esa misma temperatura de 4 °C. El precipitado obtenido se lavó dos veces, primero con etanol al 100% y después con etanol al 70%. El etanol remanente en el precipitado de proteínas se eliminó por evaporación a temperatura ambiente.

3.8.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras para la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se trataron con un amortiguador de muestra que contenía: Tris-HCl 0,0625 M a pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 10%, β -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,06%. La mezcla se calentó a 100 °C durante 5 min y, posteriormente, se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min para separar las proteínas solubilizadas en este amortiguador.

Los geles para la electroforesis se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Se usaron geles con un gel concentrador al 3% y un separador al 12,5% en poliacrilamida en presencia de SDS al 0,1%. La electroforesis se realizó a 50 V hasta que la muestra ingresó completamente al gel concentrador; a continuación, se sometió a 150 V durante media hora.

3.8.3. Tinción de los geles de poliacrilamida

La tinción de los geles se llevó a cabo con azul de Coomassie. Para ello, se mantuvieron toda la noche en una disolución que contenía metanol al 34%, Coomassie G-250 con una concentración de 1 g/l, H₃PO₄ al 2% y (NH₄)₂SO₄ al 15%. A continuación, se destiñeron con lavados sucesivos de agua destilada para revelar las bandas (Neuhoff et al., 1988).

3.9. Detección y caracterización de las *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs)

Con el fin de comprobar que el aislado de *A. hydrophila* produce moléculas señal de tipo AHL, se llevó a cabo su extracción e identificación mediante espectroscopía de masas (MS).

En primer lugar, se hizo la extracción del sobrenadante del cultivo con diclorometano (1:1) y la fase orgánica se evaporó hasta obtener el extracto seco. El extracto se disolvió en 500 ml de acetonitrilo acidificado con HCOOH al 1%. Posteriormente, se diluyó en una proporción 1/10 con una disolución de acetonitrilo (25%) en agua y HCOOH al 1%. La muestra se inyectó con una jeringa Hamilton para ionización por *electrospray* (ESI) en un espectrómetro de masas Thermo XL Orbitrap. La detección de la presencia de AHLs se basó en la identificación del fragmento *m/z* 102.054 correspondiente al anillo de la lactona (Cataldi et al., 2008).

Ensayos con acil-homoserina-lactonas (AHLs)

Inicialmente, el carbón activado procedente de hueso de oliva que se utilizó en los experimentos fue esterilizado (121 °C, 30 min). Los experimentos de formación de biopelículas producidas por *A. hydrophila* se llevaron a cabo en viales con 5 ml de medio Postgate C modificado suplementado con citrato férrico. Los viales se inocularon con células de *A. hydrophila* a una concentración de 8×10^8 células/ml y se incubaron a 30 °C en ausencia de luz.

Las AHLs utilizadas en el estudio, suministradas por Sigma, fueron 3-oxo-octanoil homoserina lactona (3-oxo-C8-AHL), 3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3-oxo-C12-AHL) y 3-oxo-tetradecanoil homoserina lactona (3-oxo-C14-AHL). Las AHLs se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) esterilizado por filtración a una concentración 50 mM y se almacenaron a -20 °C. Finalmente, se añadieron al medio de cultivo siendo la concentración final de 5 µM.

La adhesión celular y la formación de biopelículas se observó por SEM en diferentes muestras extraídas tras 1, 4, 8 y 24 horas de incubación.

3.10. Otras técnicas analíticas

3.10.1. Determinación de Fe(II) y Fe total

El contenido de Fe(II) y Fe total se determinó en los viales control y en las muestras extraídas a distintos tiempos para controlar la cinética de biorreducción. La medida de la concentración de Fe (II) extraíble con HCl se analizó mediante el método espectrofotométrico de la ferrocina (Stookey, 1970). Para ello, se preparó una disolución de ferrocina (1 g/l) en un tampón de HEPES (ácido *N*- 2- hidroxietilpiperacina-*N*-2-etanosulfónico) 50 mM y se ajustó el pH a 6,5 con NaOH 3,0 M. El procedimiento de medida fue el siguiente: se agregaron 3,0 ml de la disolución de ferrocina a 100 µl de muestra atacada con HCl concentrado. Tras mezclarse, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 562 nm con un espectrofotómetro Libra S11 de haz sencillo con una resolución de 5 nm. El blanco se preparó añadiendo 0,1 ml de agua destilada a 3 ml de la disolución de ferrocina en HEPES 50 mM. Los patrones para el análisis de Fe(II) se prepararon con sulfato ferroso de etilendiamonio ($C_2H_{10}N_2O_4S \cdot FeO_4S \cdot 4H_2O$).

Por su parte, el Fe total se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica utilizando un equipo Perkin-Elmer, modelo AAnalyst 400.

3.10.2. Cromatografía iónica (IC)

La evolución de la concentración de los aniones lactato, citrato y acetato en los cultivos microbianos se analizó mediante IC. Las medidas se realizaron con un cromatógrafo modelo 881 Compact ICpro de Metrohm equipado con un supresor y un detector de

conductividad Metrohm 850 Professional IC. Se utilizó una columna de intercambio iónico modelo Metrohm MetrosepA Supp 7 -150/4.0, compuesta por alcoholes polivinílicos. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µl con un caudal de 0,7 ml/min.

Los análisis se llevaron a cabo en las siguientes condiciones. La disolución regeneradora del supresor fue H₂SO₄ 250 mM. El eluyente que separó los analitos consistió en una mezcla de dos disoluciones de Na₂CO₃ 1 mM y Na₂CO₃ 15 mM en distintas proporciones a lo largo del tiempo. Se prepararon disoluciones multi-patrón para calibrar el aparato y cuantificar la concentración de tales analitos (fluoruro, lactato, acetato, formiato, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, fosfato, sulfato, oxalato y citrato) los cuales tienen distintos tiempos de retención. La concentración de los analitos se calculó a partir del área del pico obtenido para cada uno de ellos en cada ensayo, excepto en el caso del lactato y del acetato cuyos picos se solapan y se cuantificaron midiendo sus alturas.

Las muestras se diluyeron a una concentración 1:100, se filtraron con filtros Millipore 0,2 µm y se inyectaron directamente en el aparato. Los datos se recogieron con el programa Magicnet 3.2 de Metrohm.

3.10.3. Difracción de rayos X

Esta técnica se utilizó para caracterizar los precipitados formados durante el proceso de biorreducción de hierro en presencia de diferentes cultivos bacterianos.

Los precipitados generados se filtraron y se analizaron mediante difracción de rayos X en un equipo Philips X'pert-MPD, con ánodo de cobre, operando a una longitud de onda de 1,5406 Å. Las muestras en polvo se situaron sobre placas de cuarzo (diámetro 18 mm x cavidad 0,5 mm DP). El barrido se llevó a cabo entre 5° y 90° de ángulo 2θ, con un paso 0,04°. Las fases cristalinas se identificaron usando patrones del *International Centre for Diffraction Data* (ICDD, Newtown Square, Pennsylvania).

3.10.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja FTIR se utilizó con el fin de profundizar en la caracterización de las EPS purificadas, debido a que esta técnica permite la identificación de grupos funcionales sin necesidad de separar los componentes de la mezcla. Con este objetivo, se analizaron las EPS de la fracción coloidal y capsular producidas por *A. hydrophila* y *S. putrefaciens* en distintas condiciones reductoras de hierro.

Las EPS extraídas y purificadas según el procedimiento de la figura 14 fueron liofilizadas para su posterior caracterización mediante FTIR. La liofilización se llevó a cabo durante 48 horas, a -80°C , en un liofilizador ALPHA 2-4 LSC.

El espectro de infrarrojo se determinó en cada caso a partir de una mezcla preparada con las EPS y 250 mg de KBr (Panreac, PRS), utilizando un espectrómetro Nicolet Magna 750. Los correspondientes espectros de transmitancia se registraron en una región comprendida entre 400 y 4.000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} . El tratamiento de los datos se realizó mediante el programa informático OMNIC E.S.P. de Nicolet.

3.10.5. Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)

Se utilizó para caracterizar los cultivos bacterianos, observar los precipitados formados en el proceso de biorreducción del hierro y estudiar los fenómenos de adhesión de las bacterias a distintas superficies.

Las muestras con microorganismos se fijaron con una disolución al 2,5% de glutaraldehído y, después, se deshidrataron progresivamente con disoluciones de acetona de concentración creciente (30, 50, 70 y 90%); finalmente, se almacenaron a 4°C durante toda la noche. A continuación, se pusieron en contacto con acetona pura y se sometieron a un tratamiento de secado mediante la técnica del punto crítico (Smith and Finke, 1972) en un equipo Balzers CPD 030 con CO_2 como líquido de transición.

Cada una de las muestras seleccionadas, se recubrió por vaporización con una capa conductora de oro o de grafito (Newbury et al., 1986) y fueron posteriormente observadas y analizadas utilizando un microscopio JEOL JSM-6335 F a un voltaje de aceleración de 10-20 kV que, a su vez, tenía acoplado un sistema de microanálisis químico por dispersión de energías de rayos X (EDS).

3.10.6. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

El motivo de utilizar esta técnica fue la observación de las células de *A. hydrophila* y de los filamentos extracelulares que producen y que permiten el contacto con el mineral de gossan.

Las muestras con microorganismos se fijaron, se deshidrataron progresivamente y se sometieron a un tratamiento de secado mediante la técnica del punto crítico siguiendo el mismo procedimiento descrito para la observación mediante SEM. Las muestras se re-suspendieron en acetona y se depositaron en una rejilla de cobre. La observación se realizó con un microscopio JEOL JEM 2100, con un voltaje de aceleración de 200 kV.

3.10.7. Microscopia de fuerza atómica (AFM)

Esta técnica se utilizó para caracterizar la topografía de los nanohilos extracelulares producidos por el cultivo de *A. hydrophila* y para evaluar sus propiedades conductoras.

Las muestras bacterianas situadas sobre un soporte de grafito pirolítico altamente orientado (HOPG) se fijaron con una disolución 2,5% de glutaraldehído, se deshidrataron progresivamente con disoluciones de acetona de concentración creciente y se sometieron a un tratamiento de secado mediante la técnica del punto crítico en un equipo Balzers CPD 030 con CO₂ como líquido de transición.

Para medir la conductividad, las muestras se pegaron a un disco metálico con pintura de plata. Las medidas se llevaron a cabo con un equipo Bruke Dimension 3100 AFM con Nanoscope IVa. La punta de AFM utilizada fue del modelo ND-CTCR1-2 (constante

nominal 0,35 N/m). Se trabajó en *contact mode* obteniéndose simultáneamente las imágenes de topografía y conductividad. Mientras se realizaba el barrido, se aplicó un voltaje *bias* a la punta con respecto a la superficie del HOPG.

3.10.8. Microscopía confocal láser de barrido (CLSM)

Se utilizó con el fin de observar las biopelículas bacterianas hidratadas. La visualización de las muestras con tinciones fluorescentes se realizó con un láser de barrido LSM 510 acoplado a un microscopio invertido 100 M BP (Zeiss). Las imágenes se generaron en un modo multi-canal que permitió la obtención por separado de diferentes señales correspondientes a las respectivas longitudes de onda del láser utilizadas. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa LSM 510 versión SP2 (Zeiss), Volocity 3.5 (Improvision) and AxioVersion 3.1 (Zeiss).

3.10.8.1. Tinción de ácidos nucleicos

La distribución espacial de las células en las biopelículas se observó mediante tinciones específicas para ácidos nucleicos: DAPI (diamidino-2-fenilindol), SYTO 9 y SYTO 62. DAPI es una tinción fluorescente azul que se une selectivamente al surco menor del ADN. SYTO 9 es una tinción fluorescente verde para ácidos nucleicos de células tanto vivas como muertas. SYTO 62 exhibe una fluorescencia roja cuando tiñe los ácidos nucleicos.

3.10.8.2. Visualización de polisacáridos: ensayos con lectinas

Se seleccionaron 10 lectinas para determinar la composición de los polisacáridos presentes en las biopelículas. Para marcar los carbohidratos, se utilizó isotiocianato de fluoresceína (FITC) e isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) que se conjugaron con las lectinas: *Arachis hypogaea* (PNA), *Canavalia ensiformis* (Con A), *Erythrina cristagalli* (ECA), *Ulex europaeus* (UEA I), *Lens culinaris* (LcH), *Triticum vulgaris* (WGA), *Glycine max* (SBA), *Phytolacca americana* (PWM), *Bandeiraea simplicifolia* (BS I) y *Phaseolus vulgaris* (PHA-E). La tabla 4 muestra las 10 lectinas utilizadas en el análisis de las biopelículas con CLSM, así como su marcador y el grupo al que se unen específicamente.

Tabla 6. Lectinas conjugadas con marcadores fluorescentes utilizadas en este estudio.

Nombre y abreviatura	Origen	Marcador	Especificidad
Concanavalin A (Con A)	Judía (<i>Canavalia ensiformis</i>)	TRITC	α -mannosa, α -glucosa
Peanut agglutinin (PNA)	Cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>)	FITC	galactosa, <i>N</i> -acetilgalactosamina
Lens culinaris hemagglutinin (LcH)	Lenteja (<i>Lens culinaris</i>)	FITC	α -mannosa
Wheat germ agglutinin (WGA)	Trigo (<i>Triticum vulgaris</i>)	FITC	<i>N</i> -acetilglucosamina
Erythrina cristagalli (ECA)	<i>Erythrina cristagalli</i>	FITC	β -galactosa, <i>N</i> -acetilgalactosamina
Soybean agglutinin (SBA)	Soja (<i>Glycine max</i>)	FITC	α - y β - <i>N</i> -acetylgalactosamina
Ulex europaeus agglutinin I (UEA I)	<i>Ulex europaeus</i> (Furze gorse)	FITC	α -1,2 fucosa
Pokeweed mitogen (PWM)	<i>Phytolacca americana</i>	FITC	<i>N</i> -acetilglucosamina
Bandeiraea simplicifolia isolectin (BS I)	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	TRITC	Residuos de α -D-galactosil y <i>N</i> -acetil- α -D-galactosaminil
Phaseolus vulgaris agglutinin E (PHAE)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	FITC	Oligosacáridos

Nota: Isotiocianato de fluoresceína (fluorescein isothiocyanate, FITC); isotiocianato de tetrametil rodamina (tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE 1. Aislamiento y caracterización de microorganismos reductores de Fe(III)

La utilización de microorganismos en el tratamiento de minerales redunda en una disminución del impacto en el ambiente minero. Esta primera parte del estudio tiene por objetivo el aislamiento de microorganismos con capacidad reductora de hierro procedentes de una zona minera abandonada. Se estudia la capacidad de diferentes cultivos, consorcios naturales y aislados y cepas de colección, para utilizar Fe(III) soluble como aceptor de electrones con el fin de conocer qué cepas presentan mejor comportamiento en el proceso de biolixiviación de los minerales de hierro. En este apartado se analizan y se discuten los resultados de la capacidad reductora de Fe(III) de los diferentes cultivos estudiados.

4.1.1. El consorcio microbiano natural

Las bacterias pueden desempeñar un papel importante en el ciclo biogeoquímico del hierro. La reducción desasimilatoria de este metal es un proceso en el que tiene lugar la oxidación de compuestos orgánicos acoplada a la reducción externa de óxidos de hierro. Aunque los microorganismos reductores de hierro son ubicuos en la naturaleza, la mayoría de los estudios de laboratorio se han hecho con cepas de *Geobacter* y *Shewanella*.

Con el fin de encontrar microorganismos hierro-reductores adaptados a ambientes naturales, se llevó a cabo un muestreo en los sedimentos de un lago artificial localizado en una mina abandonada cerca de La Unión, Murcia. El objetivo principal era encontrar especies anaerobias facultativas capaces de reducir hierro férrico que pudieran utilizarse en aplicaciones biotecnológicas, especialmente relacionadas con la biolixiviación de minerales férricos, para la recuperación de este metal de una forma medioambientalmente limpia. Los sedimentos recogidos se incubaron en condiciones de anaerobiosis para determinar si los microorganismos contenidos en dichos sedimentos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

tenían dicha capacidad. Los primeros estudios de biorreducción se llevaron a cabo utilizando citrato férrico como fuente de ion férrico, ya que al tratarse de una fuente de hierro soluble es más biodisponible que cuando la fuente de hierro es un sólido. Los resultados de los análisis de ion ferroso en el medio de cultivo indicaron que en el consorcio natural crecido a partir de los sedimentos había bacterias con capacidad reductora de Fe(III).

El análisis molecular (DGGE) del consorcio bacteriano puso de manifiesto una baja diversidad de especies con tres bandas diferentes en las huellas de archeas y tres de bacterias (Tabla 5). Este hecho puede deberse a que el cultivo analizado fue adaptado a crecer en unas condiciones específicas reduciéndose el número de especies que originalmente estaban presentes en la muestra.

Tabla 7. Análisis molecular (DGGE) del consorcio natural.

Bacteria		BLAST				
Band	pb	Close sequence	Coverage (%)	Maximum identity (%)	Number of access to NCBI Database	Relative abundance (%)
1	466	Selenomona from anoxic bulk soil 16S rRNA gene (strain SB90)	99	97	AJ229242.1	22.5
3	395	Clostridium from anoxic bulk soil 16S rRNA gene (strain XB90)	99	82	FJ391486.1	13.1
15	473	Clostridium sulfatireducens 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90	99	AY943861.1	28.6
4, 2, 5	-	Not identified bands	-	-	-	-
Archaea Band 3	pb 457	Ferroplasma acidiphilium strain DR1 16S rRNA gene, partial sequence	98	98	AY222042.2	51.6
1, 2	-	Not identified bands	-	-	-	65.2

Tras el aislamiento de distintos cultivos, se identificaron mediante la secuenciación de los genes 16S rRNA varias cepas como *Clostridium celerecrescens*, *Clostridium amygdalinum*, *Serratia fonticola* y *Aeromonas hydrophila*. El análisis molecular puso de manifiesto que el género *Clostridium* fue el más abundante de los identificados y dos de los aislados se corresponden con este género.

Clostridium son bacterias flexibles en el uso de aceptores electrónicos y en condiciones anaerobias reducen hierro a través de un proceso fermentativo (Lovley, 1991; Wang et al., 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se realizó un estudio cinético de la capacidad de reducción de Fe(III) por el cultivo del consorcio natural usando como fuente de hierro citrato férrico soluble. La evolución de la concentración de ion ferroso, tanto en la fase acuosa como en el conjunto del contenido del vial (disolución y precipitado) durante la reducción del citrato férrico, se muestra en la figura 15a. El consorcio microbiano natural redujo el ión férrico de forma rápida y efectiva alcanzándose la biorreducción total en 36 horas. No obstante, como se pone de manifiesto en la figura 15a, el Fe(II) no se mantuvo en disolución. A medida que crecía el cultivo, la concentración de ion ferroso en la disolución disminuía, al mismo tiempo que aumentaba en el precipitado que se formaba durante el ensayo. La incorporación del Fe(II) al residuo sólido es una desventaja desde el punto de vista de la aplicación industrial de este bioproceso, ya que una condición esencial para la biolixiviación anaerobia de los óxidos férricos es que el hierro ferroso permanezca en disolución para poder obtener el metal siguiendo una ruta hidrometalúrgica. No obstante, si la mayoría del Fe(II) procedente de la reducción microbiana de Fe(III) se encuentra en fase sólida, estos productos minerales pueden tener un gran impacto en la movilización de contaminantes orgánicos o inorgánicos (Salas et al., 2010) de manera que podrían ser de utilidad en procesos de biorremediación.

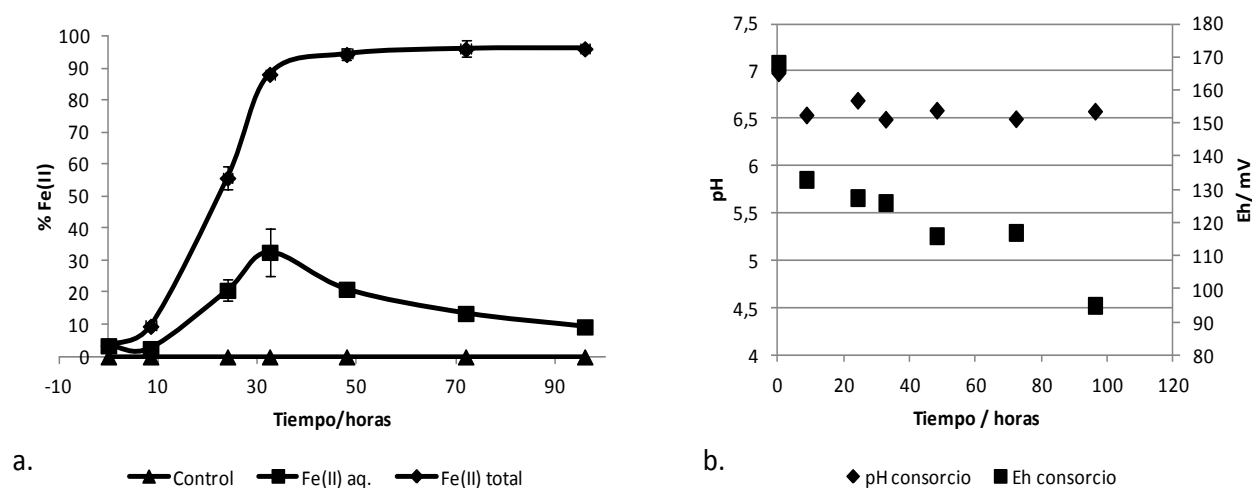


Figura 15. (a) Cinética de reducción del hierro férrico con el cultivo del consorcio microbiano natural. Concentración inicial de Fe (suministrado como citrato férrico soluble): 60 mM. Los puntos son la media de la cantidad de Fe (II) reducida con barras de error estándar (n=2). Las barras de error no visibles son de tamaño inferior a los símbolos. (b) Evolución del pH y del potencial durante el proceso de biorreducción.

El estado del hierro en el medio depende de muchos factores entre los que destacan el pH, el potencial y la presencia de agentes complejantes. Las medidas realizadas en el control sin inocular mostraron que los valores de pH y Eh se mantenían estables a lo largo del tiempo, con valores en torno a 6.95 ± 0.05 y 253 ± 5 mV, respectivamente.

Se hizo un seguimiento de la evolución del pH y del potencial redox en el medio inoculado con el consorcio natural durante la biorreducción del hierro (Figura 15b). El valor del pH disminuyó inicialmente y posteriormente se mantuvo constante, en torno a 6.5, durante todo el proceso. Este descenso inicial del pH se puede explicar por la producción de diferentes ácidos orgánicos durante la oxidación microbiana de las fuentes de carbono y por las reacciones de precipitación de compuestos insolubles de hierro (II) que implican la producción de protones, como se explicará a continuación.

En relación al potencial redox, esta variable registró un descenso asociado al propio proceso de reducción, como consecuencia del aumento de la concentración de Fe(II) y de la disminución de la concentración de Fe(III) en el medio de reacción. Atendiendo a la ecuación de Nerst (2), la producción microbiana de Fe(II) conlleva una reducción del valor del potencial en el medio. El potencial de reducción del par Fe(III)-citrato/ Fe(II)-cittrato a pH neutro es $E = 0.385$ V (Bird et al., 2011).

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Fe^{2+}]}{[Fe^{3+}]} \quad (2)$$

También se estudió la evolución de los principales aniones presentes en el medio de cultivo: citrato, lactato y acetato. Conviene recordar que los dos primeros se añaden al medio como fuente de hierro y como sustrato fermentativo, mientras que el acetato es uno de los productos del metabolismo de los microorganismos. La determinación de dichos iones se realizó mediante cromatografía iónica y los resultados de su evolución en el tiempo se muestran en la figura 16.

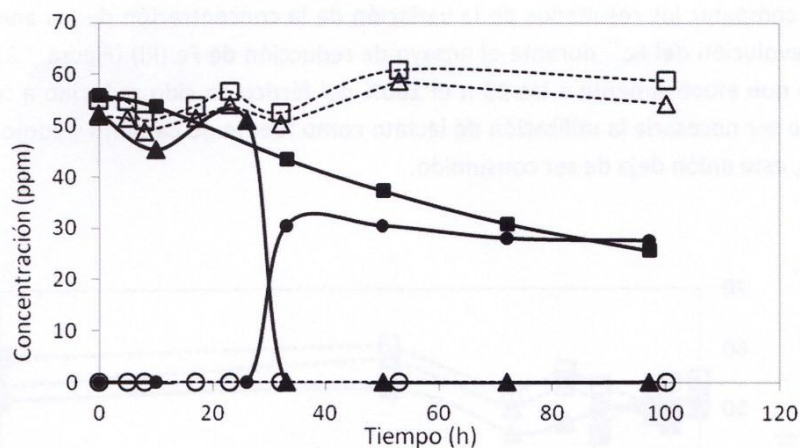
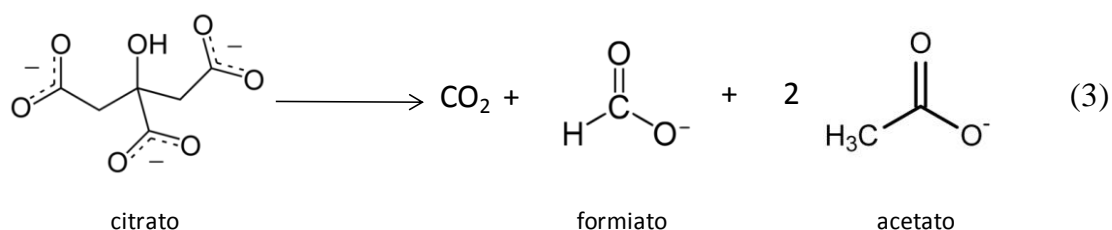


Figura 16. Evolución de los aniones citrato, lactato y acetato durante la biorreducción de Fe(III) soluble con el consorcio natural (Δcitrato control, ▲citrato consorcio, □lactato control, ■ lactato consorcio, ○ acetato control, ● acetato consorcio).

La concentración de citrato disminuyó bruscamente transcurridas 32 h de incubación desapareciendo prácticamente del medio de cultivo. Dicha disminución coincidió con el aumento de la concentración de acetato que no estaba presente inicialmente y que se generó durante el proceso, alcanzándose una concentración de 30 mg/L. La explicación de este hecho reside en la utilización del citrato por las bacterias como fuente de energía. El metabolismo del citrato de la mayoría de las bacterias es rápido. Los productos de dicho metabolismo dependen del pH del medio (McFaddin, 2000). A pH 7 generalmente se forman formiato y acetato, de acuerdo con la siguiente reacción:



La formación de estos ácidos orgánicos explicaría la acidificación del medio observada al comienzo de la reacción (Figura 15b). Además, estos procesos tienen lugar cuando se alcanza el máximo de reducción de Fe(III) y cuando el precipitado comienza a enriquecerse en Fe(II), como se puso de manifiesto en la figura 15a. La desaparición del

citrato que actúa como quelante del hierro y lo mantiene en disolución, propició la precipitación del hierro presente en el medio.

También se observó una disminución lenta de la concentración de lactato. Probablemente, otros microorganismos capaces de respirar mediante procesos no fermentativos utilizan este sustrato como fuente de energía. Los productos procedentes del metabolismo fermentativo también podrían servir como fuente de carbono para otras especies presentes en el consorcio. En los sedimentos naturales donde tiene lugar la reducción de Fe(III), por ser éste el aceptor de electrones más abundante, la oxidación de la materia orgánica se produce con la colaboración de organismos que llevan a cabo tanto procesos respiratorios como fermentativos (Scala et al., 2006).

La cantidad y la naturaleza de los productos secundarios generados en la reducción desasimilatoria de Fe(III) dependen en gran medida de las especies microbianas del cultivo. El análisis por difracción de rayos X del precipitado formado durante la biorreducción de Fe(III) soluble con el cultivo del consorcio natural permitió identificar la presencia de siderita (FeCO₃) (figura 17).

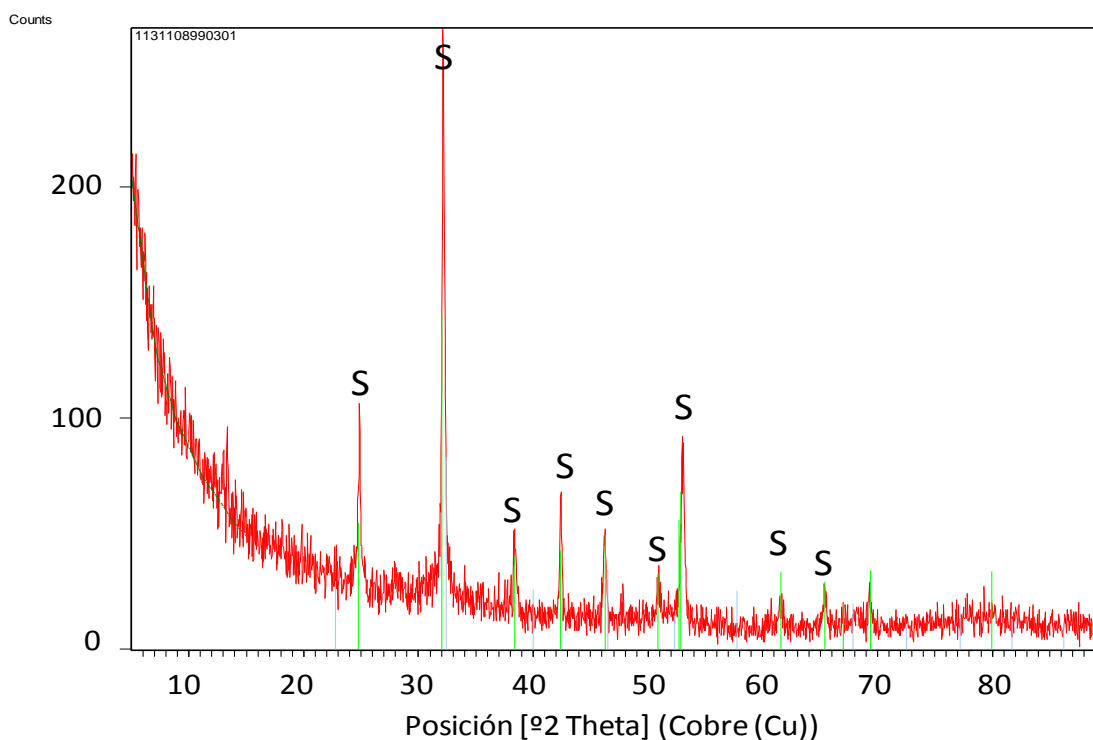
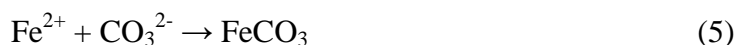
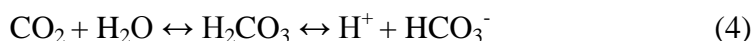


Figura 17. Difractograma de rayos X del precipitado producido por el consorcio natural. S = siderita.

Para justificar la precipitación del Fe(II) como carbonato hay que tener en cuenta que la utilización de los ácidos orgánicos y de sus sales como fuente de carbono por parte de las bacterias produce carbonatos y bicarbonatos alcalinos que reaccionarían con el Fe(II) procedente del metabolismo celular, dando lugar a la aparición de siderita como precipitado, así como a una bajada de pH del medio, aunque el tampón bicarbonato ($pK_a = 6,14$) contribuye a regularlo. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



Las imágenes SEM del residuo del ensayo de reducción de citrato férrico con el consorcio natural muestran una gran cantidad de células que en algunos casos están conectadas mediante filamentos (Figura 18). Algunas bacterias han desarrollado sistemas que les permiten detectar células vecinas mediante contacto y realizar procesos que facilitan su supervivencia y crecimiento (Hayes et al., 2010). Los sistemas de contacto entre células sirven para coordinar el movimiento celular entre miembros de la misma especie, inducen la simbiosis o regulan las rutas metabólicas en la competición entre especies.

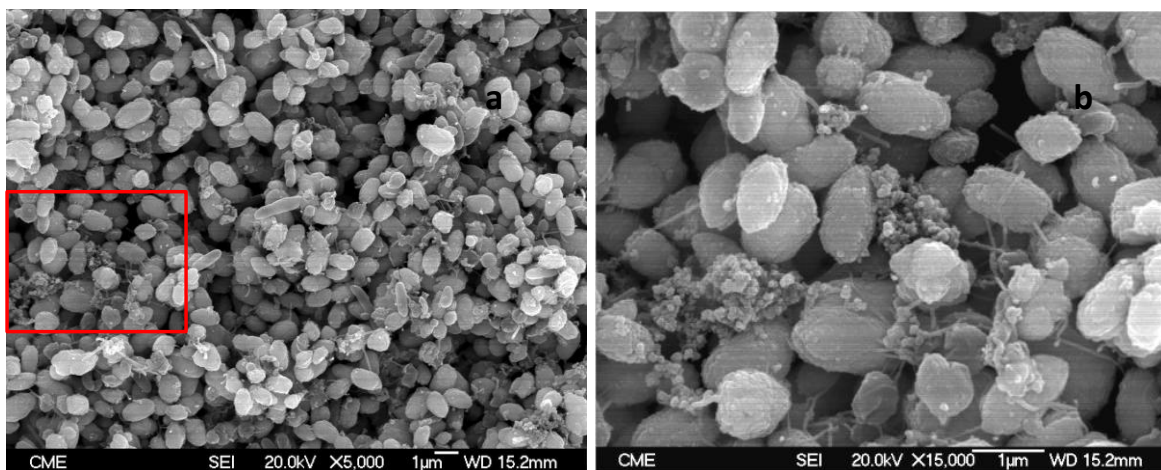


Figura 18. Micrografías SEM del residuo obtenido en el ensayo de biorreducción de Fe(III) soluble con el consorcio natural.

4.1.2. El aislado *Aeromonas hydrophila*

El aislado *A. hydrophila*, procedente del consorcio natural, se seleccionó para el estudio de la biorreducción del hierro ya que se obtuvieron buenos resultados en su presencia desde el punto de vista de su aplicación en biolixiviación (García-Balboa et al., 2010). Generalmente, los consorcios microbianos reducen el Fe(III) de forma más eficiente que los aislados al tener lugar simultáneamente varios mecanismos fermentativos y respiratorios de las distintas especies presentes en el consorcio. Sin embargo, el aislado *A. hydrophila* fue capaz de reducir el Fe(III) suministrado como citrato a mayor velocidad que el consorcio (Figura 19a).

A. hydrophila es una bacteria anaerobia facultativa y es capaz de acoplar la oxidación de ácidos orgánicos a la reducción de Fe(III). La cinética de reducción de Fe(III) soluble por el cultivo de *A. hydrophila* fue rápida (figura 19): más del 80 % del hierro suministrado como citrato férrico se redujo a Fe(II) en aproximadamente 30 horas. Cabe destacar que el ion ferroso se mantuvo en disolución durante todo el proceso de biorreducción, lo que supone una ventaja adicional con respecto al cultivo natural. Esta característica fue clave para la selección de esta especie ya que podría permitir tanto la lixiviación de los metales contenidos en los minerales, como su extracción y recuperación a partir de la propia disolución.

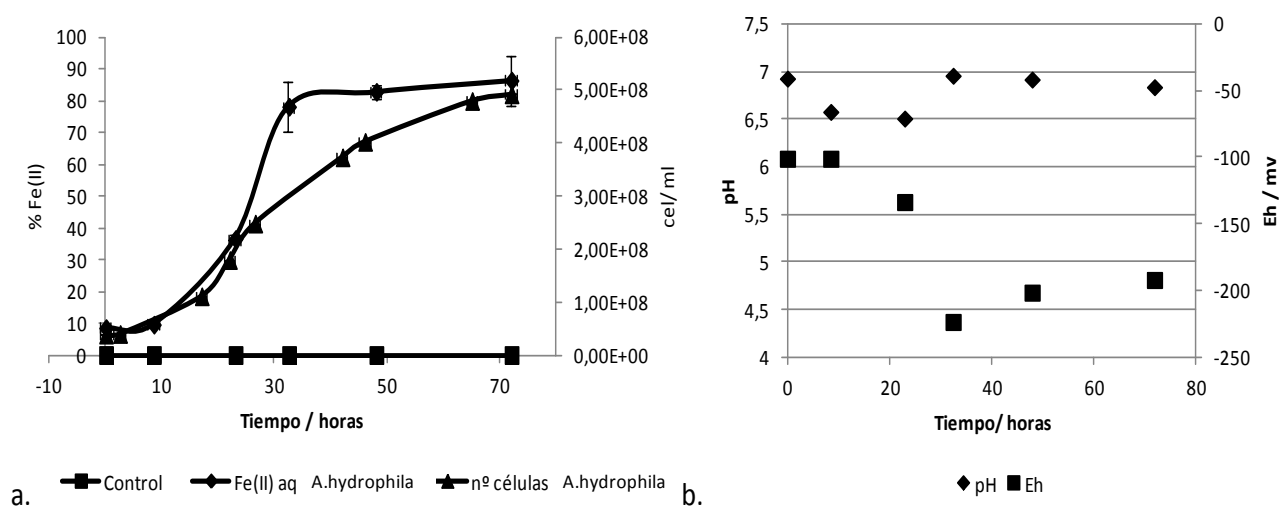


Figura 19. (a) Cinética de reducción del hierro férrico con el cultivo de *A. hydrophila*. Concentración inicial de Fe (suministrado como citrato férrico soluble): 60 mM. (b) Evolución del pH y del potencial durante el proceso de biorreducción.

La figura 19b pone de manifiesto los cambios de pH y potencial en el medio durante la biorreducción del citrato férrico. El pH se mantuvo en torno a la neutralidad a lo largo del proceso ya que este es el pH óptimo de crecimiento de esta bacteria y en el que desarrolla mayor actividad enzimática (O'Reilly and Day, 1983). El potencial redox experimentó un acusado descenso, paralelo a la reducción de Fe(III), que, como se explicó anteriormente, es función de la variación de la relación $[\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}]$ (ec. 2).

La bacteria *A. hydrophila* tiene cadena respiratoria y oxida el lactato y otros ácidos orgánicos. Con el fin de observar la evolución de la concentración de las principales fuentes de carbono que esta cepa podría utilizar durante la biorreducción del citrato férrico, se analizaron estos compuestos orgánicos mediante cromatografía iónica. La figura 20 muestra la variación de la concentración de los aniones lactato y citrato en función del tiempo de reacción. Se observa una disminución de la concentración de lactato ligada al aumento de la concentración de Fe^{2+} , lo que indica que podría tener lugar la oxidación del lactato acoplada a la reducción del ión férrico de acuerdo con la siguiente reacción (Lovley, 1991).



La oxidación de este compuesto orgánico, utilizando Fe(III) como aceptor de electrones, proporcionaría la energía necesaria para el crecimiento celular.

Sin embargo, la concentración de citrato durante el ensayo se mantuvo constante a diferencia de lo que ocurriría con el cultivo natural. Que el ion ferroso permanezca en disolución tras el proceso de biorreducción indica que probablemente *A. hydrophila* no está utilizando el citrato como fuente de carbono en su metabolismo y permanece en la disolución en una concentración suficientemente alta como para complejar todo el Fe(II) a medida que éste se produce. Aunque se generó bicarbonato como producto de la oxidación del lactato, la constante de complejación del citrato con el ion ferroso es lo suficientemente alta ($\log K = 4,8$) como para evitar la precipitación de carbonatos. Por tanto, se puede concluir que el ion citrato es el ligando responsable de la complejación y de la solubilización del hierro reducido en presencia de la bacteria *A. hydrophila*.

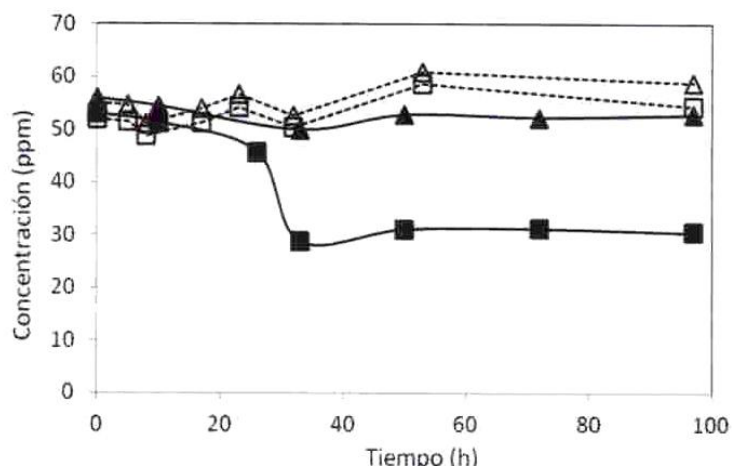


Figura 20. Evolución de los aniones citrato y lactato durante la biorreducción de Fe(III) soluble con *A. hydrophila* (Δ citrato control, ▲ citrato *A. hydrophila*, □ lactato control, ■ lactato *A. hydrophila*).

Las observaciones del cultivo de *A. hydrophila* mediante SEM muestran, como hecho más destacable, la existencia de unos filamentos en la superficie de las células que podrían ser secreciones tipo IV y tipo VI con forma de pili características de las especies de *Aeromonas* (Figura 21). Seshadri y sus colaboradores secuenciaron el genoma completo de *A. hydrophila* ATCC 7966 y encontraron varias regiones que codifican pili y fimbrias (Seshadri, *et al.*, 2006). Estas estructuras superficiales estarían implicadas en la adhesión o reconocimiento entre células para iniciar procesos de colonización y, además, podrían controlar los movimientos microbianos (Hayes *et al.*, 2010).

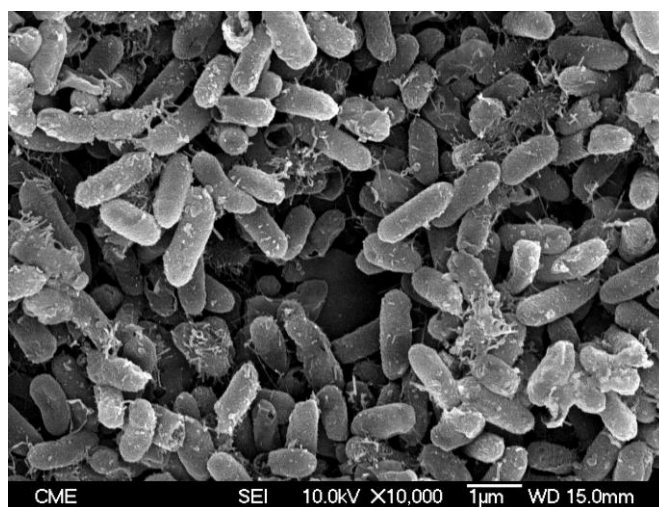


Figura 21. Micrografía SEM del aislado *A. hydrophila* en el ensayo de biorreducción de Fe(III).

4.1.3. Un cultivo de colección: *Shewanella putrefaciens*

La *S. putrefaciens* que se utilizó fue una cepa de la colección alemana DSMZ. Se decidió su uso en este trabajo porque es uno de los microorganismos con capacidad reductora de Fe(III) cuyos mecanismos han sido mejor estudiados convirtiéndose, por tanto, en un punto de referencia para el estudio comparativo del mecanismo de reducción de los cultivos tratados en el presente trabajo de investigación.

Los resultados de la reducción de Fe(III) con *S. putrefaciens* se muestran en la figura 22a. En ella, se pone de manifiesto que esta cepa fue capaz de reducir prácticamente el 100% del Fe(III) suministrado. Además, con *S. putrefaciens* se mantiene en disolución el ion ferroso producido durante la biorreducción del citrato férrico, siendo esta una de las características más valiosas desde el punto de vista de su aplicación en biolixiviación.

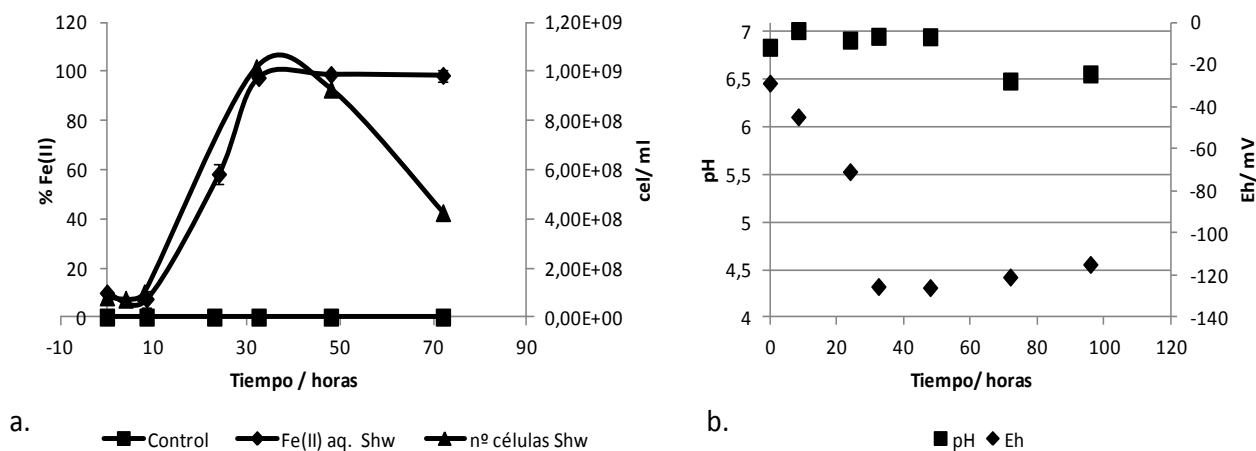


Figura 22. (a) Cinética de reducción del hierro férrico en el cultivo de *S. putrefaciens*. Concentración inicial de Fe (suministrado como citrato férrico soluble): 60 mM. (b) Evolución del pH y del potencial durante el proceso de biorreducción.

La figura 22b muestra la evolución del pH y del potencial redox durante el proceso de biorreducción de Fe(III) soluble con *S. putrefaciens*. Como se puede observar, el pH permaneció en torno a la neutralidad. Este comportamiento se puede explicar atendiendo a los metabolitos que genera el cultivo bacteriano. Esta especie está bien

documentada y se sabe que no oxida el lactato completamente y que en el proceso de biorreducción se forma acetato a la vez que se reduce el ion férrico, según la reacción:



La aparición de bicarbonato en la disolución implica su tamponamiento de forma que el pH del medio queda regulado a pesar de la generación de protones.

El potencial disminuyó como consecuencia de la reducción del Fe(III). Como ya se explicó en apartados anteriores, la producción de Fe(II) conlleva un aumento de la relación $[\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}]$ (ec. 2) y una reducción del potencial del medio.

La bacteria *S. putrefaciens* oxida el lactato pero también puede utilizar como sustrato otros ácidos orgánicos, como el piruvato, el formiato y el succinato. Además, puede reducir una gran variedad de aceptores electrónicos incluyendo nitrato, nitrito, glicina, fumarato, tiosulfato, sulfito, cromato o U(VI) entre otros (Lovley, 1991). La figura 23 muestra la evolución de la concentración de los aniones lactato y citrato durante la biorreducción del Fe(III). Se observó una fuerte disminución de la concentración de lactato, coincidiendo con el aumento de la concentración de Fe(II) observado en la figura 22a, lo que indica que tiene lugar su oxidación ligada a la reducción del Fe(III).

No obstante, el análisis mediante cromatografía iónica puso de manifiesto que *S. putrefaciens* no utiliza el citrato como dador de electrones ya que la concentración de este anión en la disolución permaneció constante durante la reducción de Fe(III). Por tanto, el ion citrato sería el ligando responsable de la complejación y solubilización del hierro reducido.

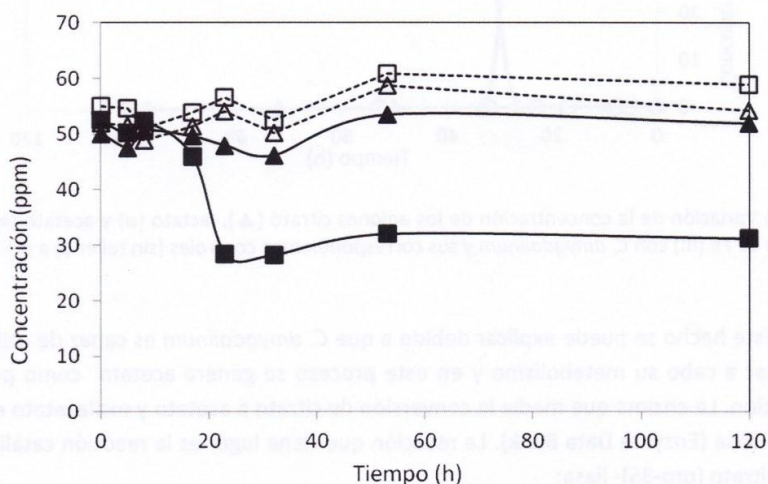


Figura 23. Evolución de los aniones citrato y lactato durante la biorreducción de Fe(III) soluble con la cepa *S. putrefaciens* (Δ citrato control, ▲ citrato *S. putrefaciens*, □ lactato control, ■ lactato *S. putrefaciens*).

En la figura 24 se muestra una imagen de SEM del cultivo de *S. putrefaciens* después del ensayo de reducción de Fe(III) en la que se observa la morfología bacilar de estos microorganismos.

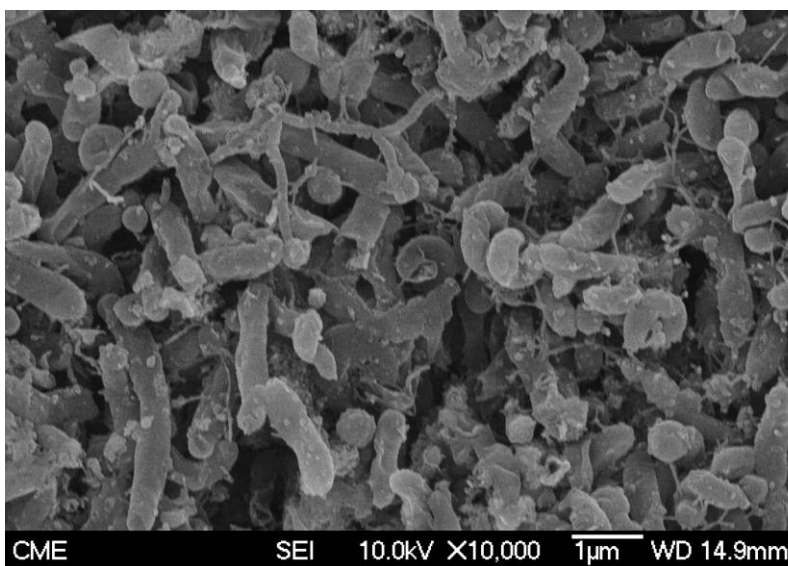


Figura 24. Micrografía SEM del aislado *S. putrefaciens* en el ensayo de biorreducción de Fe(III) soluble.

4.1.4. Comparación de la biorreducción de citrato férrico con los diferentes cultivos

La cinética de reducción de Fe(III) con los tres cultivos estudiados se muestra en la figura 25. Como puede apreciarse, tanto el consorcio microbiano natural como las cepas puras de *A. hydrophila* y de *S. putrefaciens* fueron capaces de crecer en condiciones de anaerobiosis cuando se utilizó citrato férrico soluble como fuente de hierro. En todos, los casos, la velocidad de reducción del Fe(III) fue muy similar y se alcanzaron porcentajes de Fe(II) generado por los microorganismos superiores al 80%. Por tanto, el hecho de que la fuente de ion férrico sea una sal soluble de Fe(III) hace que este ión sea fácilmente accesible para los microorganismos, es decir, es más biodisponible, y que el rendimiento de la bioreducción sea alto.

Cabe destacar que las cepas de *A. hydrophila* y *S. putrefaciens* mantuvieron el Fe(II) en disolución. Este comportamiento no se observó en los experimentos con el consorcio natural en los que el hierro ferroso precipitó como siderita (FeCO_3). La concentración de Fe(II) en el cultivo del consorcio natural fue siempre inferior que en los correspondientes a las bacterias aisladas y alcanzó un máximo coincidiendo con la etapa exponencial de crecimiento bacteriano.

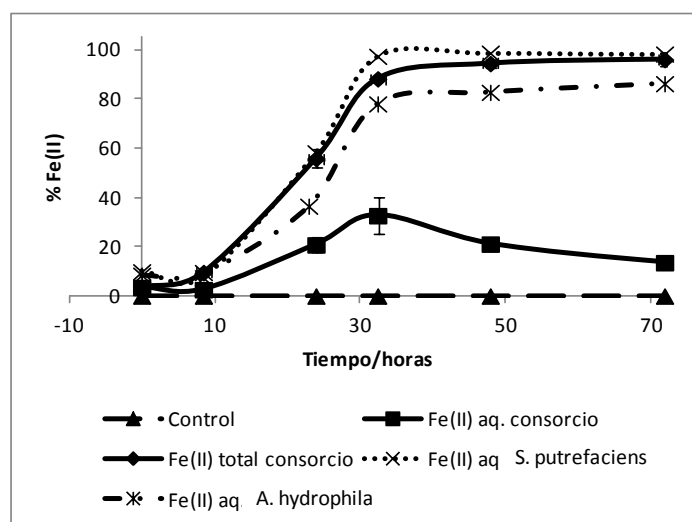


Figura 25. Comparación de la cinética de reducción de Fe(III) en los diferentes cultivos ensayados. Concentración inicial de Fe (suministrado como citrato férrico soluble): 60 mM.

Como se ha puesto de manifiesto en los apartados anteriores, las diferencias en cuanto a la solubilización o precipitación del Fe(II) biogénico durante el proceso de reducción se encuentran en el metabolismo de las fuentes de carbono de los diferentes microorganismos. Las especies *A. hydrophila* y *S. putrefaciens* utilizan el lactato para su crecimiento pero no oxidan el citrato, por tanto, éste permanece disponible en la disolución y actúa como agente quelante del ion ferroso. Por su parte, los microorganismos presentes en el consorcio natural son capaces de utilizar tanto el citrato como el lactato como fuente de carbono. El citrato, que mantenía el hierro en la fase acuosa, desaparece del medio de cultivo, mientras que aparecen los metabolitos, acetato y dióxido de carbono, generados durante su oxidación. El CO₂ da lugar a la formación de carbonatos que reaccionan con el Fe(II) precipitándolo como siderita.

La formación de carbonatos de hierro debido a la acción de bacterias reductoras de hierro en experimentos de laboratorio ya había sido documentada por otros investigadores (Fredrickson et al., 1998; Mortimer and Coleman, 1997). El aislamiento y caracterización del microorganismo reductor de Fe(III) *Geobacter metallireducens* fue el primer estudio en el que se observó la precipitación de siderita en laboratorio (Lovley and Phillips, 1986b). Este microorganismo reduce oxihidróxidos amorfos de Fe(III) dando lugar a siderita y magnetita en condiciones de anaerobiosis estricta.

La formación del mineral siderita se produce por altas concentraciones de CO₂ procedente del metabolismo de la materia orgánica. La precipitación de carbonatos favorece la oxidación del lactato. La biomineralización del hierro en los ambientes acuáticos juega un papel importante en la biogeoquímica del hierro y del carbono puesto que se consume el CO₂ enriqueciendo en hierro los sedimentos de zonas anaerobias. Además, la formación de siderita podría ser importante en biorremediación al favorecer la oxidación de materia orgánica o de contaminantes presentes en el medio (Roh et al., 2006; Zachara et al., 2002).

Por otro lado, los compuestos orgánicos pueden interaccionar fuertemente con el hierro, tanto férrico como ferroso. Los metabolitos y las moléculas orgánicas presentes en los diferentes cultivos pueden quelar el metal y, en consecuencia, las actividades de solubilidad pueden variar de unos cultivos a otros (Kraemer et al., 2005; Lee et al., 2007). Los estudios de Lee y sus colaboradores muestran que la fuente de carbono utilizada (lactato, piruvato y formato) afecta de forma diferente a la formación de

minerales mediante el cambio de las condiciones químicas del cultivo de una cepa de *Shewanella*.

Los resultados más relevantes del estudio de biorreducción de citrato férrico con los diferentes cultivos microbianos se han incluido en la tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de reducción microbiana de citrato férrico. Cantidad de Fe(III) inicial: 60 mM.

	$[\text{Fe}^{2+}]_{\text{aq.}} / \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	$[\text{Fe(II)}]_{\text{t}} / \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	% Fe(II) soluble	% Fe(III) transformado	Composición del residuo
Cultivo natural	0,9	3,7	9,3	96,2	Siderita FeCO_3
<i>S. putrefaciens</i>	3,4	3,4	99,7	99,7	-
<i>A. hydrophila</i>	3,0	3,0	86,3	86,3	-

4.1.5. Adaptación de los cultivos a valores de pH moderadamente ácidos

Los estudios hidrometalúrgicos han puesto de manifiesto que, en general, la lixiviación de los minerales férricos se favorece si se lleva a cabo a pH ácido, puesto que sólo en esas condiciones el hierro está en disolución, como se pone de manifiesto en el diagrama de Pourbaix del hierro (figura 26).

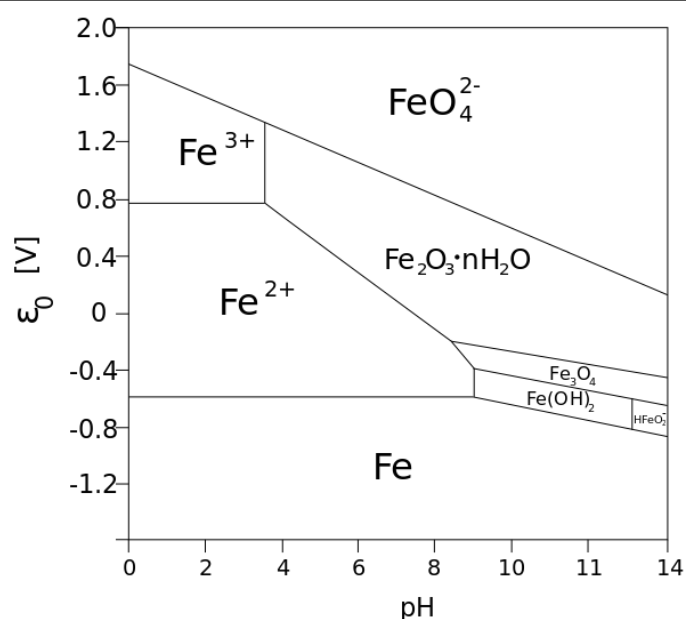


Figura 26. Diagrama de Pourbaix del hierro.

Sin embargo, la biorreducción del Fe(III) por las bacterias estudiadas en este trabajo necesita un pH neutro, ya que éste es el valor de pH óptimo para su crecimiento. Desde el punto de vista de la cinética de disolución, sería deseable que el hierro estuviera más biodisponible, lo que podría conseguirse mediante la disminución del pH del medio. Sin embargo, para ello es necesario que las bacterias sean capaces de mantener su actividad en esas condiciones. Con el fin de determinar si las bacterias podían crecer y reducir hierro (III) a pH inferiores al óptimo de crecimiento, se llevó a cabo una adaptación progresiva de los microorganismos a valores de pH moderadamente ácidos.

Se realizaron ensayos con los tres cultivos estudiados pero sólo el consorcio microbiano fue capaz de crecer a pH inferior a 5. En la figura 27a se compara de la cinética de reducción de citrato férrico mediante el consorcio microbiano natural a pH 7 y el consorcio adaptado progresivamente a pH 4,5. En ambos casos, se consigue la reducción de todo el Fe(III), si bien la velocidad de reducción a pH ácido es ligeramente inferior que a pH neutro. A pH 4,5 se alcanzó el máximo porcentaje de Fe(II) en 48 h mientras que a pH 7 el máximo se observó transcurridas 30 h.

Con relación a la evolución del pH durante los ensayos realizados a diferentes valores del pH inicial, se observó una tendencia a estabilizarse alcanzándose el mismo valor de pH final en ambos casos (Figura 27b). Durante el experimento con el cultivo adaptado a

pH ácido cabe destacar el incremento de este parámetro desde 4,5 hasta un valor aproximado de 6,8, que suele ser el pH óptimo de crecimiento del consorcio natural. Como se ha explicado con anterioridad, en los procesos de oxidación de compuestos orgánicos se forma dióxido de carbono que en medio acuoso da lugar a bicarbonatos y carbonatos con capacidad reguladora de pH manteniéndolo en valores próximos a la neutralidad.

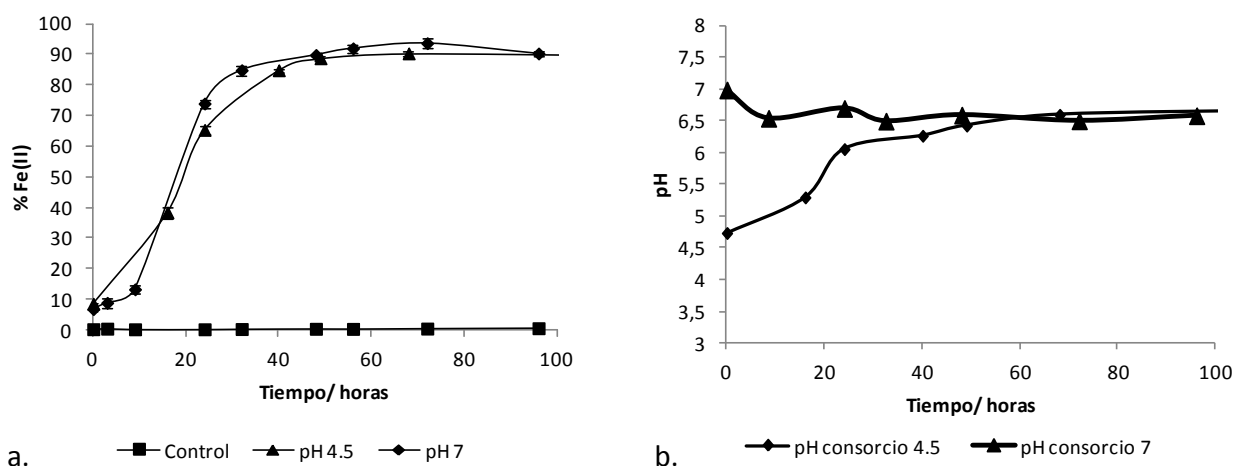


Figura 27. (a) Cinética de reducción de hierro a valores de pH iniciales de 7 y 4,5 con el consorcio microbiano. Concentración inicial de Fe: 60 mM (suministrado como citrato férrico soluble). (b) Evolución del pH durante los ensayos de biorreducción.

El hecho de que *A. hydrophila*, un aislado procedente del consorcio natural, no fuese capaz de crecer a pH moderadamente ácido podría indicar que algunos de los microorganismos presentes en el consorcio, que sí fueron capaces de crecer a pH ácidos, incrementaron el pH de la disolución de manera que, una vez alcanzado un valor adecuado de pH, en el medio se produciría el crecimiento de otras especies.

Algunos investigadores han realizado intentos para adaptar microorganismos neutrófilos reductores de Fe(III) o de sulfato a medios con pH ácido; no obstante, estas bacterias no fueron capaces de crecer en esas condiciones (García-Balboa et al., 2010; Petrie et al., 2003). Se sabe que valores bajos de pH pueden ocasionar una disminución de la actividad microbiana por la inactivación de las enzimas y la alteración de la bomba de protones (Langworthy, 1979).

Sin embargo, existe la posibilidad de utilizar otro tipo de bacterias que pueden llevar a cabo una disolución reductora de hierro a pH ligeramente ácidos. Diversas especies de bacterias acidófilas, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que aunque son más conocidas como hierro oxidantes, son capaces de llevar a cabo la reducción y disolución de minerales férricos para recuperar los metales de forma más económica (Hallberg et al., 2011; Johnson, 2012).

Conclusiones de la Parte 1. Part 1 Conclusions

Las conclusiones más importantes alcanzadas en esta primera parte del estudio fueron los siguientes:

- 1) El consorcio microbiano natural procedente de la zona minera de La Unión que contenía microorganismos con capacidad reductora de Fe(III). Se aislaron e identificaron cuatro especies bacterianas con capacidad reductora de Fe(III): *Clostridium celerecrescens*, *Clostridium amygdalinum*, *Serratia fonticola* y *Aeromonas hydrophila*. El género más abundante fue *Clostridium*.
- 2) Se seleccionaron el aislado *A. hydrophila* y el cultivo de colección *S. putrefaciens* ya que fueron capaces de reducir el Fe(III) soluble con un rendimiento superior al 80% y de mantener el Fe²⁺ en disolución.
- 3) Los microorganismos presentes en el consorcio utilizan el citrato como sustrato fermentativo. La metabolización del citrato por las bacterias da lugar a la disociación del complejo que este anión forma con el Fe(III), de modo que sin citrato en la disolución y a pH neutro el Fe(III) precipita.
- 4) *A. hydrophila* y *S. putrefaciens* utilizan únicamente el lactato como fuente de carbono. En presencia de estas bacterias el citrato permanece en el medio de cultivo, por lo tanto, el citrato es el ligando responsable de la complejación y de la solubilización del Fe(II) generado por la biorreducción de Fe(III) en los cultivos puros.
- 5) Sólo el consorcio microbiano natural fue capaz de reducir el Fe(III) a valores de pH moderadamente ácidos. Puesto que la oxidación de la fuente de carbono

(lactato) conlleva la formación de carbonato y bicarbonato, se origina un tampón en el medio que eleva el pH hasta valores en torno a la neutralidad.

Los microorganismos que presentan capacidad para reducir y solubilizar el hierro son los principales candidatos para ser empleados en un proceso de biolixiviación de minerales de hierro pues permitirán la recuperación de hierro de una forma medioambientalmente limpia.

The most important findings corresponding to Part 1 of the study can be summarized as follows:

- 1) The natural microbial consortium collected from the mine area of La Unión presented several microorganisms able to reduce Fe(III). Four strains of iron-reducing bacteria were isolated from the consortium and later identified: *Clostridium celerecrescens*, *Clostridium amygdalinum*, *Serratia fonticola* and *Aeromonas hydrophila*. The genus *Clostridium* was the most abundant.
- 2) The isolate *A. hydrophila* and the type strain *Shewanella putrefaciens* were selected to conduct the study due to their ability to reduce the soluble Fe(III), with a yield over 80%, and to keep Fe²⁺ in the aqueous phase.
- 3) The microorganisms present in the consortium use citrate as fermentative substrate. The bacterial metabolism of citrate leads to the Fe(III)-complex dissociation while in absence of citrate Fe(III) precipitated at neutral pH.
- 4) *A. hydrophila* and *S. putrefaciens* use only the lactate as carbon source. The citrate remains in the media in these bacterial cultures. In consequence, the citrate is the ligand responsible for the solubilization of Fe(II) generated by the bioreduction of Fe(III) in the pure cultures.
- 5) The natural consortium was the only microbial culture able to reduce Fe(III) at moderated acidic pH values. The oxidation of the carbon source (lactate) leads

to the formation of a carbonate/bicarbonate buffer system that increases the pH to circumneutral values.

Those microorganisms able to reduce and dissolve iron are the main candidates for the mineral bioleaching study. These bacteria may be an environmentally friendly alternative to recover this metal.

PARTE 2. Biolixiviación reductora de sólidos férricos: jarositas sintéticas y naturales

En esta parte del trabajo se presenta el estudio de la biolixiviación reductora de minerales férricos, concretamente de jarositas, con el fin explorar la aplicación de este proceso para la extracción del hierro como ion ferroso soluble y la recuperación posterior del metal. La investigación se llevó a cabo con tres minerales férricos, suministrados como única fuente de Fe(III) para el crecimiento de los microorganismos: una mezcla de jarositas de amonio y potasio sintetizadas biológicamente en presencia de la archea *Sulfolobus metallicus*, una jarosita de plata sintetizada químicamente y un gossan natural procedente de la mina de Río Tinto. Se ha evaluado el comportamiento de los tres cultivos de bacterias reductoras de hierro (consorcio natural, *Shewanella putrefaciens* y *Aeromonas hydrophila*) frente a los tres minerales. Para cada sustrato mineral, se ha realizado un estudio comparativo de la capacidad de reducción del Fe(III) y de disolución del Fe(II) generado con cada uno de los cultivos. La discusión se ha completado con el análisis de la evolución del pH y del potencial y con el estudio, por SEM y DRX, de la transformación y de la composición de los residuos de biolixiviación.

Los oxihidróxidos de Fe(III) aparecen en suelos y sedimentos presentando formas muy variadas, desde fases amorfas, como la ferrihidrita, hasta minerales bien cristalizados, como la hematita o la goethita. Los minerales férricos no sólo presentan diferente grado de cristalinidad, sino también distintos tamaños de partícula, área superficial específica y solubilidad. La cinética de reducción abiótica de los minerales de hierro utilizando ascorbato disminuye sistemáticamente siguiendo el orden ferrihidrita > lepidocrocita > goethita > hematita (Larsen and Postma, 2001). Los factores que influyen en la cinética de la reducción enzimática de Fe(III) en los minerales no se conocen con exactitud

(Bonneville et al., 2009). Munch y Ottow observaron que las bacterias reducen el Fe(III) de los compuestos amorfos preferentemente al de los oxihidróxidos cristalinos y entre las diferentes fases cristalinas la reactividad sigue el orden lepidocrocita > hematita > goethita (Munch and Ottow, 1983). Algunos autores apuntan a que es el área específica el factor controlante de la velocidad y de la extensión de la bioreducción (Roden and Zachara, 1996), mientras que otros relacionan la reducción con la solubilidad y la disponibilidad del Fe(III) presente en los minerales (Bonneville et al., 2004)

Habitualmente, se han utilizado minerales amorfos de Fe(III) como aceptores electrónicos en los experimentos de reducción microbiana de hierro debido a que, como se ha mencionado, no presentan estructura cristalina y, por ello, son más fáciles de reducir. Sin embargo, los minerales cristalinos también pueden ser reducidos (Bonneville et al., 2009; Coggon et al., 2012; Roden and Urrutia, 2002).

Las jarositas $[\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6]$ son minerales cristalinos de sulfato férrico que se forman en condiciones ácidas. Aparecen de forma natural en suelos con sulfatos (Fanning et al., 1993) y en afloramientos de rocas sulfurosas. Además, el Fe(III) de las aguas ácidas generadas en la actividad minera puede precipitar en forma de tales jarositas (Nordstrom and Alpers, 1999). Recientemente, la jarosita fue identificada en la superficie de Marte mediante un espectro Mössbauer obtenido por la *Mars Exploration Rover Opportunity*, aportando pruebas de la existencia de aguas ácidas con sulfatos en este planeta (Elwood Madden et al., 2004).

Algunos minerales del grupo de las jarositas tienen especial interés en metalurgia extractiva; por ejemplo, la plumbojarosita y la argentojarosita son, en ocasiones, lo suficientemente abundantes como para ser consideradas como menas de plomo y plata. La explotación de minerales de plata más antigua documentada se encontraba en Río Tinto (España), donde los depósitos de sulfuros se habían oxidado a gossan, una acumulación jarosítica. Se estima que unas dos toneladas de jarositas, de las cuales la mayoría contendría plata, se trataron en la minería de la época romana. Se ha confirmado que las soluciones sólidas de jarositas y beudantita son las fuentes de este metal noble más importantes en Río Tinto (Viñals et al., 1995).

Las jarositas no sólo aparecen de forma natural, actualmente el mayor interés metalúrgico de estos sulfatos básicos de hierro se encuentra en el campo de la

hidrometalurgia donde se usan en procedimientos industriales para eliminar impurezas y controlar la cantidad de hierro, sulfato, metales alcalinos y otros elementos en los circuitos hidrometalúrgicos. Por ejemplo, la precipitación de jarosita puede utilizarse para eliminar hierro y sulfato en el proceso de lavado de carbones con bajo contenido en sulfuros (Norton et al., 1991). La formación de jarosita también se usa para purificar las disoluciones de lixiviación en los procesos hidrometalúrgicos de obtención de zinc, cobre y cobalto a partir de menas de sulfuros, puesto que permite precipitar el hierro con pérdidas bajas de metales divalentes como zinc, cobre y níquel (Dutrizac and Jambor, 2000).

Las jarositas, a pesar de ser minerales férricos muy comunes, han sido poco estudiadas en procesos de biorreducción y biolixiviación anaerobia.

4.2.1. Biolixiviación reductora de jarositas de amonio y potasio

Para evaluar la capacidad de lixiviación reductora de minerales férricos con los cultivos seleccionados, se utilizó una jarosita generada por el cultivo de la archaea termoacidófila *S. metallicus*. El mineral, obtenido por la precipitación del Fe(III) como sulfato básico, fue un sólido amarillo. La caracterización mineralógica de la jarosita, realizada mediante SEM (Figura 28a) y mediante DRX, puso de manifiesto su naturaleza cristalina (Figura 28b). La jarosita se identificó como una mezcla de jarositas de amonio ($\text{NH}_4\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$) y de potasio ($\text{KFe}_2(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$).

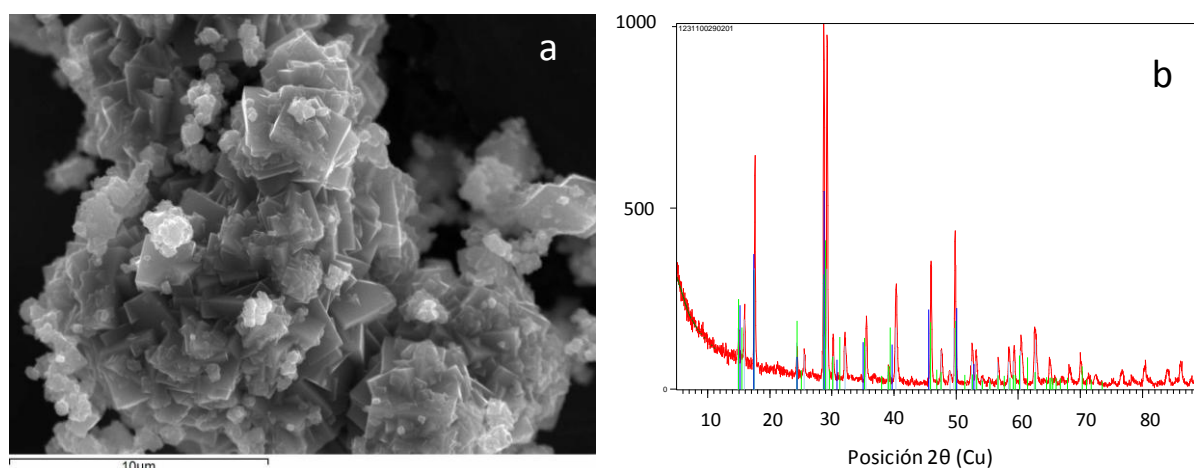


Figura 28. Caracterización de las jarositas sintetizadas por *Sulfolobus metallicus*: (a) Imagen FE-SEM de electrones secundarios y (b) difractograma de rayos X (verde: K-jarosita, y azul: NH_4 -jarosita).

La jarosita se suministró al medio de cultivo como única fuente de Fe(III), utilizando en todos los casos una concentración de Fe(III) 60 mM, y se incubó con los diferentes cultivos de microorganismos objeto de estudio.

a) Biolixiviación con el consorcio natural

Los controles abióticos pusieron de manifiesto que los componentes del medio de cultivo no pueden movilizar ni reducir químicamente el ion férrico en condiciones de anaerobiosis y pH circumneutro (Figura 29).

Cuando la jarosita se incubó con el consorcio natural, se generó un precipitado negro que evidenció la transformación de la jarosita por la acción microbiana. La reducción microbiana de Fe(III) se siguió a lo largo del tiempo mediante la medida de la formación de Fe(II), que puede encontrarse disuelto en la fase acuosa y/o precipitado en el residuo sólido. Los resultados de la evolución tanto del Fe(II) disuelto como del Fe(II) total se recogen en la figura 29a.

El cálculo del porcentaje del ion ferroso de la fase acuosa se realizó mediante la siguiente expresión:

$$\% Fe(II)_{aq.} = \frac{[Fe(II)(aq)]}{[Fe\ total]} \cdot 100 \quad (7)$$

donde [Fe(II) (aq)] es la concentración de Fe(II) del sobrenadante, y [Fe total] es la concentración de hierro total, tanto ferroso como férrico, existente en el vial ya sea en la disolución (hierro soluble) o en el residuo sólido (hierro insoluble).

El porcentaje de Fe(II) total generado en la fase acuosa o como sólido por reducción del mineral, se determinó de la siguiente forma:

$$\% Fe(II)_{total} = \frac{[Fe(II)_{total}]}{[Fe\ total]} \cdot 100 \quad (8)$$

donde [Fe(II) total] es la concentración de Fe(II) existente en la mezcla agitada del vial, tanto sólido como soluble, y [Fe total] es la concentración de hierro total, tanto ferroso como férrico, en el vial agitado.

La reducción del Fe(III) debida a la acción del consorcio natural fue muy rápida ya que se alcanzó el porcentaje de Fe(II) máximo, aproximadamente el 70% de reducción del

hierro férrico suministrado inicialmente, en seis días de incubación. Sin embargo, el ion ferroso no se mantuvo en la fase acuosa sino que precipitaba a medida que se generaba pasando a formar parte del residuo sólido (Figura 29a). En dicho residuo, se detectó la presencia de un precipitado de color negro que es característico del sulfuro de hierro producido en el proceso de biorreducción por las bacterias sulfato-reductoras. Los primeros indicios de la presencia de este compuesto se tuvieron durante el procedimiento analítico puesto que en el ataque del sólido con ácido clorhídrico concentrado para la determinación del Fe(II) total, se detectó el olor característico del ácido sulfhídrico (H_2S) que confirmó la presencia de FeS.

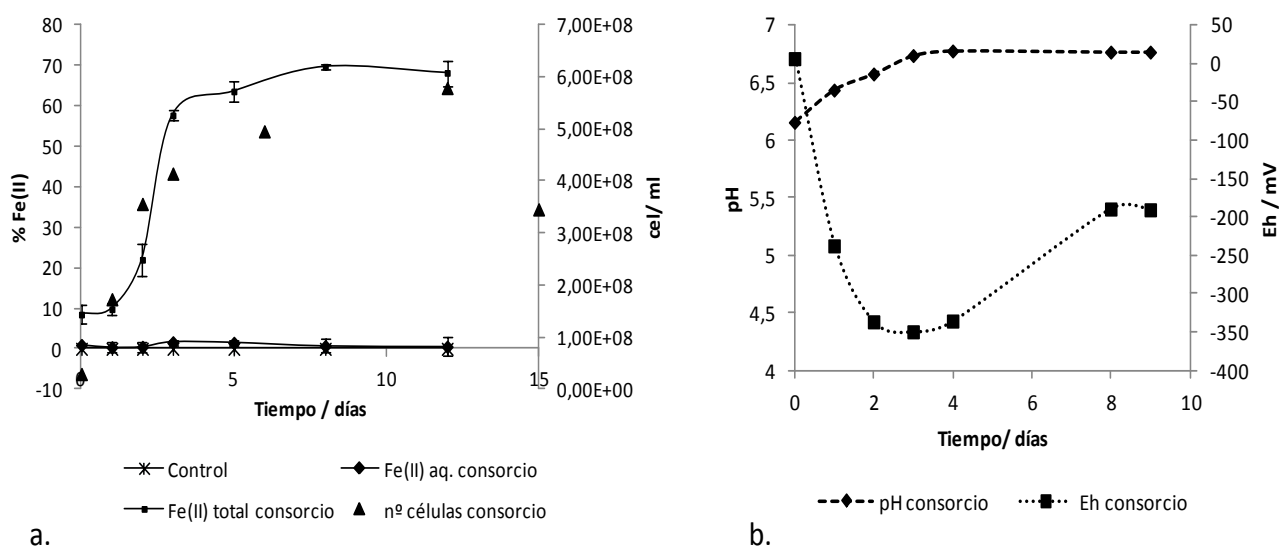


Figura 29. Biolixiviación de jarositas de amonio y de potasio con el consorcio natural. (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el ensayo.

La figura 29b muestra la evolución del pH y del potencial redox durante el ensayo de biolixiviación con el consorcio natural.

El pH, después del pequeño aumento inicial, se estabilizó en torno a un valor de 6,8, alcanzado, probablemente, por el efecto tampón de los productos metabólicos del proceso de biorreducción. Este cultivo también contiene especies que llevan a cabo

procesos fermentativos y respiratorios para la oxidación de las fuentes de carbono, como se puso de manifiesto en la primera parte de esta memoria. En este sistema, los resultados apuntan a que la mezcla de comunidades de bacterias hierro- y sulfato-reductoras, presentes en el consorcio natural, habrían contribuido simultáneamente a la transformación de la jarosita.

La caracterización del cultivo mediante técnicas moleculares evidenció que el género predominante era *Clostridium*. Algunas especies de *Clostridium*, entre ellas *Clostridium amygdalinum* (Jayasinghearachchi et al., 2010), producen hidrógeno mediante procesos fermentativos como el indicado a continuación:



Algunos investigadores indican que las bacterias sulfato-reductoras prefieren fuentes de carbono de bajo peso molecular como el lactato, el acetato o el formiato (Blodau and Knorr, 2006), que podrían ser productos de otros procesos fermentativos microbianos (Figura 30).

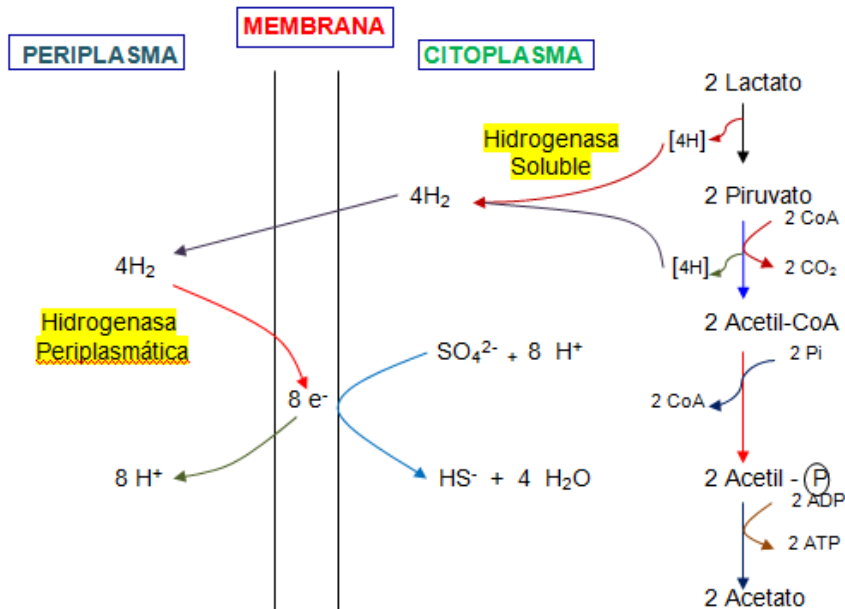
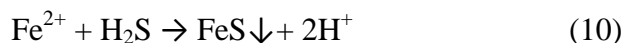
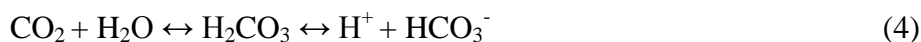


Figura 30. Biorreducción del sulfato con lactato como fuente de carbono.

Los productos de la reducción del sulfato darían lugar a la precipitación de sulfuros de metales pesados según la siguiente reacción:



Aunque la precipitación de los sulfuros de hierro implica la acidificación del medio, los protones generados pueden ser neutralizados por los OH^- formados en la reacción de oxidación de las fuentes de carbono por las bacterias sulfatorreductoras (reacción 11). En esta reacción también se forma CO_2 que en el medio de cultivo da lugar a un medio tamponado que mantiene el pH del medio en torno a la neutralidad (reacción 4).



Por otro lado, se registró un brusco descenso del potencial de forma simultánea a la formación de Fe(II) por la generación de productos reducidos, como fácilmente se puede concluir a partir de la ecuación de Nerst (ecuación 2).

En la figura 31 se muestra una imagen de SEM del residuo generado por biolixiviación de la jarosita con el consorcio microbiano natural. El sólido atacado no presenta la cristalinidad que poseía la jarosita antes del ensayo (Figura 28a). La mayor parte de las partículas presentan una superficie irregular como consecuencia del ataque bacteriano; no obstante, se pueden distinguir zonas sin reaccionar que mantienen la cristalinidad. Los microorganismos se encontraban sobre la superficie del sólido transformado.

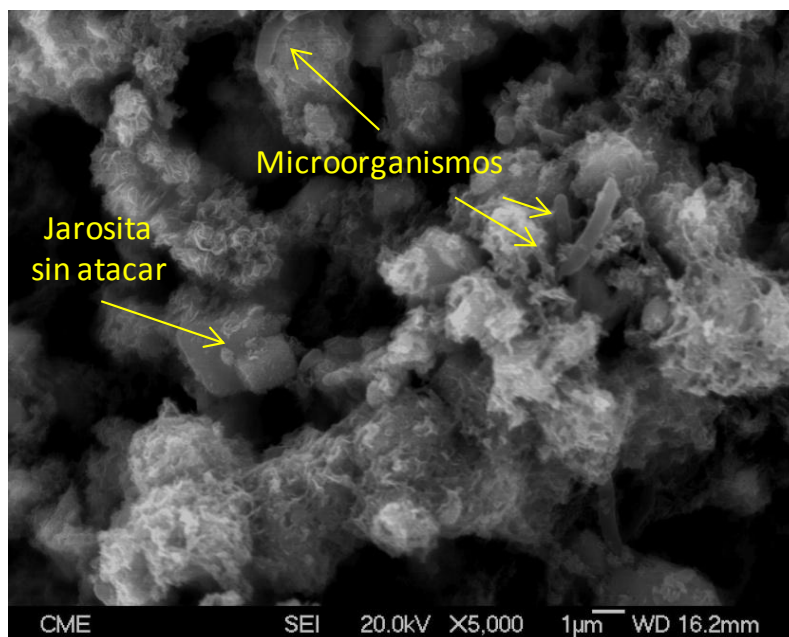


Figura 31. Micrografía FE-SEM del residuo de biolixiviación de las jarositas con el consorcio microbiano natural.

Con el fin de identificar los productos generados por este cultivo mixto, el residuo formado durante el ataque microbiano se analizó mediante DRX (Figura 32). El difractograma puso de manifiesto que el producto obtenido tenía un cierto carácter amorfo al no identificarse con claridad todos los picos. Entre los principales productos de Fe(II) identificados se encuentran: la siderita (FeCO_3), un carbonato de Fe(II), y la vivianita ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), un fosfato de Fe(II); ambos minerales son frecuentes en medios anóxicos. Las altas concentraciones de HCO_3^- generadas en la oxidación del lactato favorecen la nucleación de la siderita (reacción 5). Por otro lado, el uso de fosfato como nutriente en el medio de cultivo conduce a la precipitación del Fe(II) producido durante la biorreducción como vivianita. Gran parte del fosfato se adsorbe inicialmente sobre el mineral de Fe(III) y se incorpora directamente como vivianita durante la biorreducción (Fredrickson et al., 1998). Por ello, aparece asociado a otros minerales biogénicos. También se pudieron identificar algunos picos correspondientes a la jarosita sin reaccionar.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el producto negro observado sería característico del sulfuro de hierro producido por las bacterias sulfato-reductoras. Tanto el ion férrico Fe(III) como el sulfato SO_4^{2-} pueden servir como aceptores finales de

electrones para las bacterias anaerobias. El sulfuro de Fe(II) no se identificó en el difractograma, posiblemente por presentar un carácter amorfo.

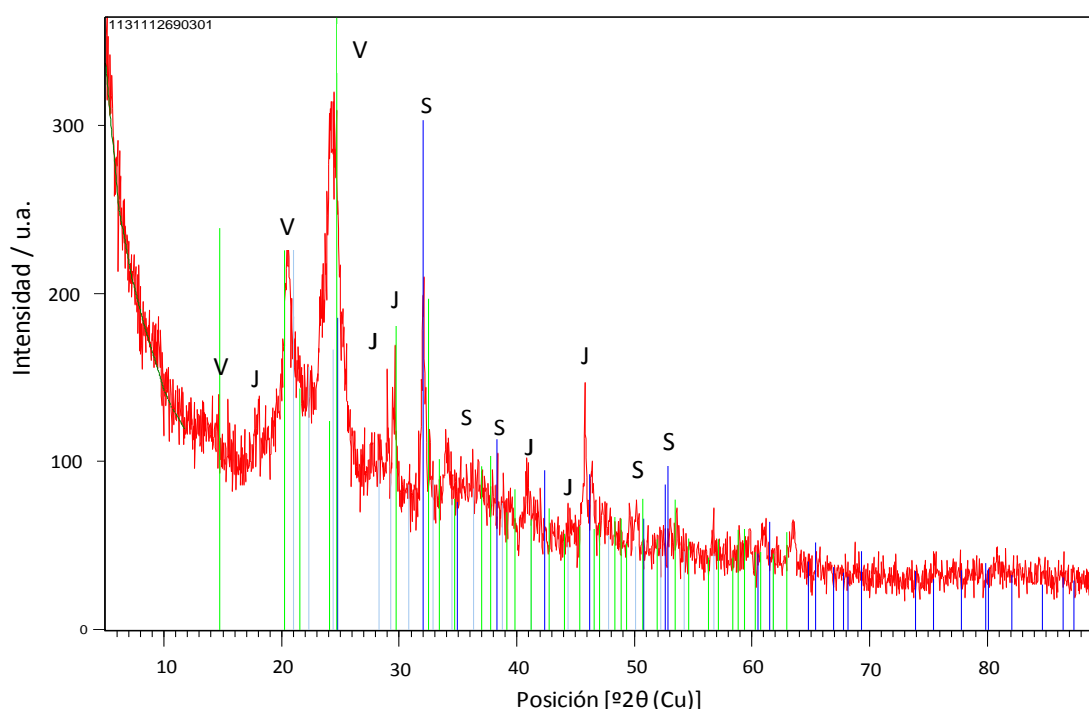


Figura 32. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y potasio con el consorcio microbiano natural. S = siderita; V = vivianita; J = jarosita.

El hecho de que la jarosita sirva como sustrato para bacterias hierro- y sulfato-reductoras hace que la utilización de este consorcio sea muy interesante como estrategia pasiva de recuperación ambiental de drenajes ácidos procedentes de minas. Aunque se han encontrado bacterias sulfato-reductoras en muchos lugares donde hay drenajes ácidos de minas (Johnson et al., 1993; Koschorreck, 2008), su actividad se ve, a menudo, limitada por el pH ácido y la baja disponibilidad de materia orgánica.

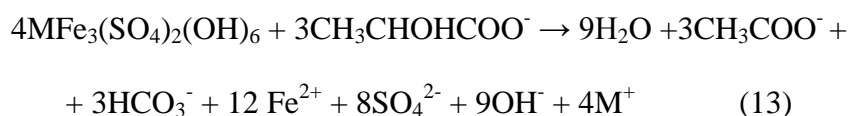
Sin embargo, la reducción desasimilatoria de hierro puede tener lugar a pH ácidos y puede llevarse a cabo por muchas especies de bacterias que emplean gran variedad de dadores de electrones (Bridge and Johnson, 2000; Hallberg et al., 2010). En este proceso, por oxidación de la materia orgánica, se consumen protones de manera que se alcanzan valores de pH superiores a 4,5, más favorables para el crecimiento de las poblaciones de bacterias sulfato-reductoras. En estas condiciones puede tener lugar la

precipitación de metales pesados (reacción 12) y, con ello, la regeneración de los drenajes ácidos:



b) Biolixiviación con *Shewanella putrefaciens*

Como ya se ha mencionado en el estudio de *S. putrefaciens* en la Parte 1 del capítulo de Resultados, esta bacteria no oxida el lactato completamente y genera acetato como producto del metabolismo (Lovley, 1991). Este proceso estaría acoplado a la reducción de Fe(III). En el caso de la biorreducción de jarositas tendría lugar la siguiente reacción:



S. putrefaciens fue capaz de utilizar las jarositas de potasio y amonio como fuente de Fe(III) para su respiración metabólica, como se muestra en la figura 33a. Al cabo de 36 días el cultivo transformó el 87% del Fe(III) suministrado como mineral insoluble. La principal ventaja que presentó esta cepa fue su capacidad para disolver el mineral y liberar el Fe(II) obtenido a la fase acuosa. El 59% del hierro presente en el medio de cultivo fue reducido y solubilizado. Esta característica hace que *S. putrefaciens* sea un microorganismo potencialmente aplicable a procesos biotecnológicos como la biolixiviación reductora para la recuperación de metales.

Los cambios geoquímicos ocurridos en los medios inoculados se siguieron a través de las medidas de pH y potencial redox (Figura 33b). El pH se mantuvo en valores en torno a 6,3 a lo largo de todo el ensayo. Sin embargo, el potencial experimentó un brusco descenso tras la inoculación inicial que después se mantuvo constante tras el día 2 del ensayo. Este cambio fue propiciado por el proceso de biorreducción.

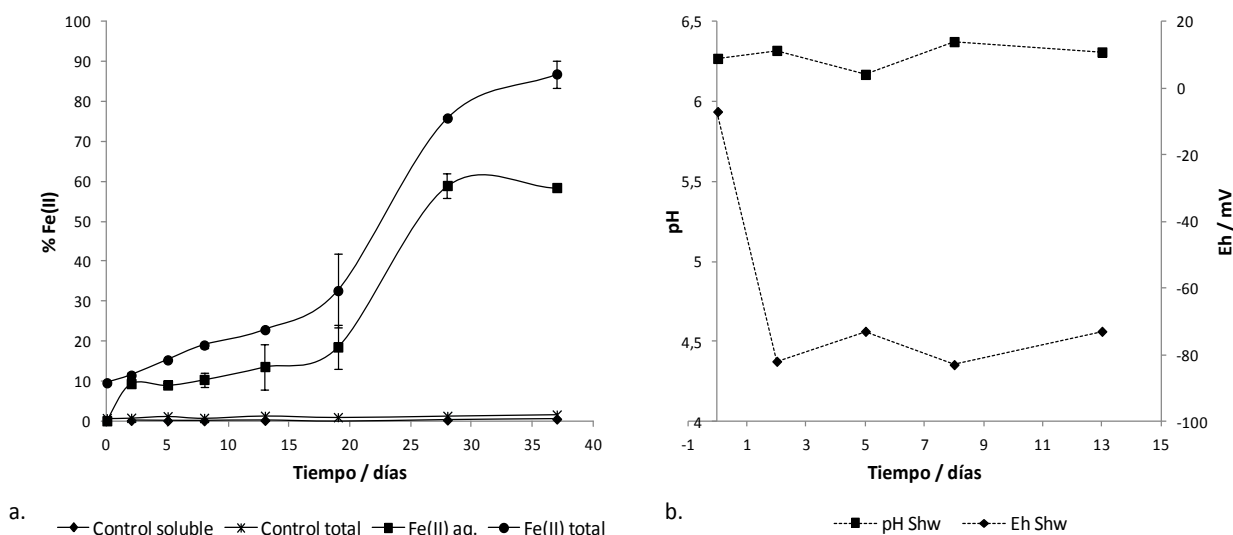


Figura 33. Biolixiviación reductora de las jarositas de amonio y de potasio con *S. putrefaciens*. (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el proceso de biorreducción.

La reducción de Fe(III) a pH circumneutros presenta dos retos para los microorganismos: el estado sólido de las fuentes de hierro y el bajo valor del potencial de algunos minerales de hierro que hacen que la energía disponible de la oxidación de fuentes orgánicas de carbono sea limitada. No obstante, *Shewanella* es capaz de adaptarse y obtener energía en estas circunstancias (Bird et al., 2011).

En las figuras 34a y b se muestran las imágenes de SEM del residuo sólido resultante de la biorreducción de las jarositas de amonio y de potasio con el cultivo de *S. putrefaciens*. Entre los productos del ataque cabe destacar la presencia de una matriz bastante degradada, en la que se encuentran las bacterias, y dos tipos de partículas de diferente morfología, unas esféricas y otras cristalinas. El análisis elemental EDS de las distintas fases observadas en el residuo indica que los cristales contienen hierro, fósforo y oxígeno, por lo que se trataría de un fosfato de hierro (II), identificado como vivianita ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) (Figura 34c); y en las esferas los únicos elementos identificados fueron el hierro y el oxígeno en la proporción: 70,16% de oxígeno y 29,84% de hierro (Figura 34d). El carbono no pudo considerarse debido a que las muestras se recubren con este elemento con el fin de mejorar su conductividad para una mejor observación de las mismas.

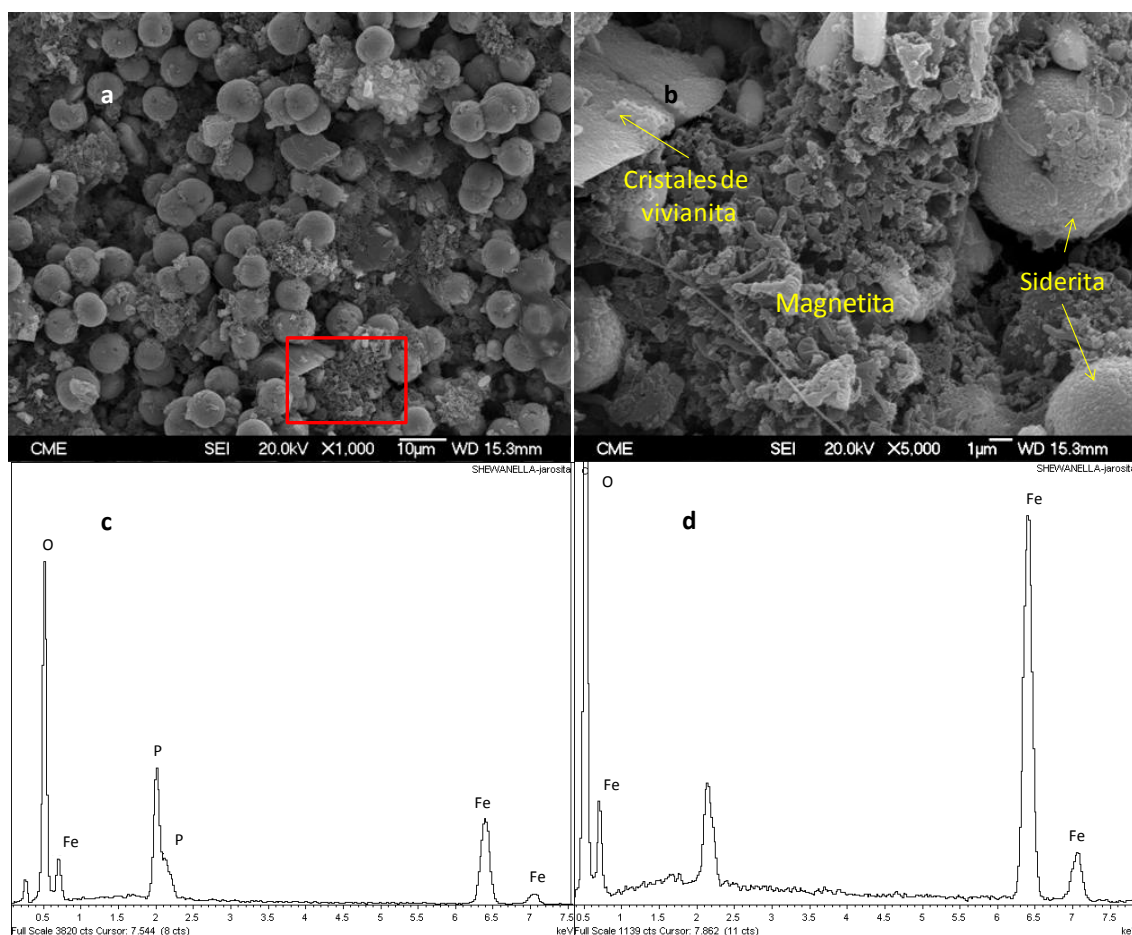


Figura 34. (a) y (b) Micrografías FE-SEM del residuo de biolixiviación de las jarositas con el cultivo de *S. putrefaciens*. (c) Análisis EDS de las partículas cristalinas. (d) Análisis EDS de las partículas esféricas.

Esta información se complementó con un análisis por DRX (Figura 35) en el que se identificaron los minerales principales presentes en el residuo sólido como siderita (FeCO_3), vivianita ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) y magnetita (Fe_3O_4). La proporción atómica obtenida por microanálisis EDS sugiere que las esferas serían la siderita y la matriz la magnetita. La presencia de magnetita, óxido mixto de Fe(II) y Fe(III), indica que una parte del hierro permaneció como Fe(III) en el residuo generado por *S. putrefaciens*.

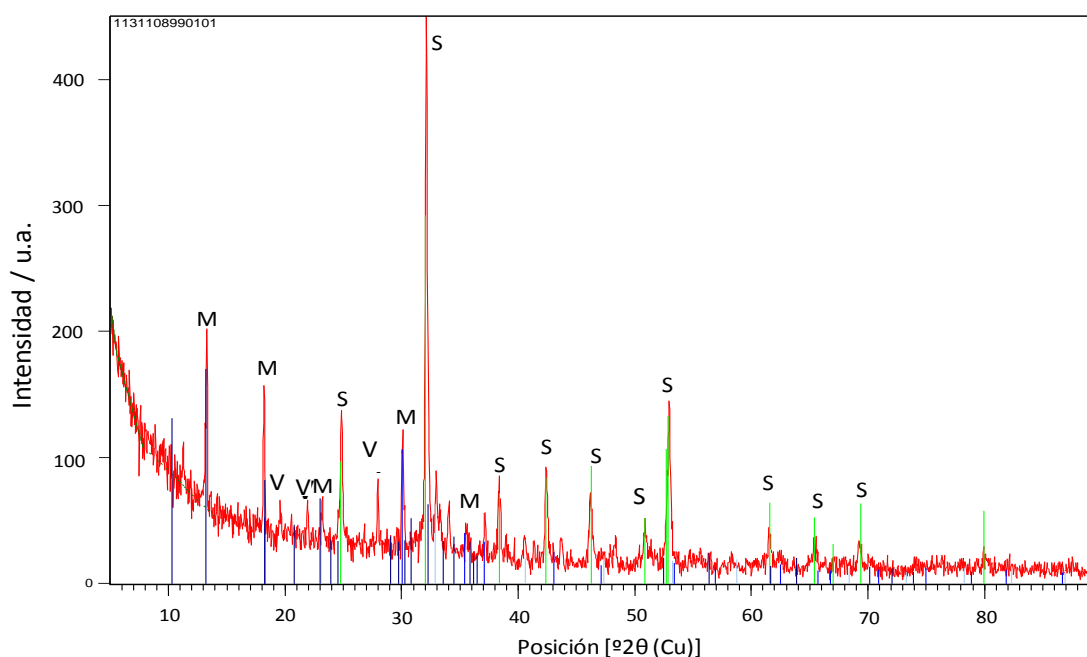


Figura 35. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y potasio con *S. putrefaciens*. S = siderita; M = magnetita; V = vivianita.

c) Biolixiviación con *Aeromonas hydrophila*

El aislado *A. hydrophila*, procedente del consorcio natural, también fue capaz de utilizar el Fe(III) presente en las jarositas de amonio y potasio como fuente de ion férrico para la respiración.

En la figura 36a se muestra la cantidad de Fe(II) producido y solubilizado por la cepa de *A. hydrophila*. Con esta bacteria, se consiguió reducir el 14% del Fe(III) suministrado en 44 días de ensayo. Cabe destacar que, aunque la velocidad de reducción y el rendimiento de la reducción fueron bajos comparados con los cultivos del consorcio natural y de *S. putrefaciens*, *A. hydrophila* fue capaz de mantener en disolución el 8% del ion ferroso generado a partir del hierro suministrado en forma de mineral insoluble.

Con relación a la evolución del pH y del potencial durante la biolixiviación de la jarosita (Figura 36b), los resultados muestran la misma tendencia que con *S. putrefaciens*. El pH se mantuvo en torno a 6,3 y el potencial redox descendió progresivamente asociado a la formación de Fe(II)

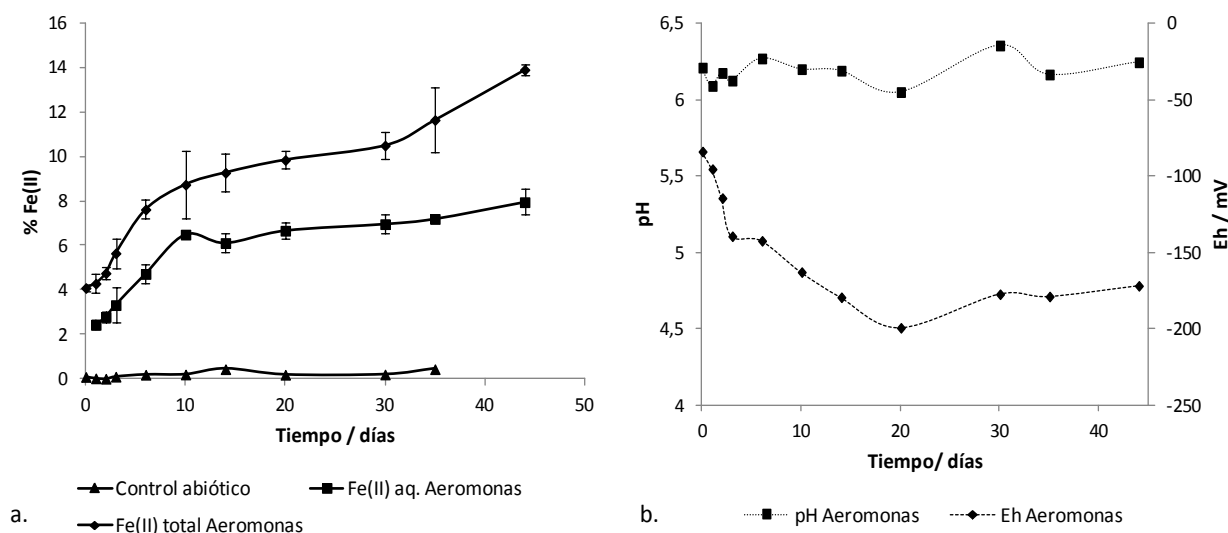


Figura 36. Biolixiviación reductora de las jarositas de amonio y potasio con *A. hydrophila* (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el proceso de biorreducción.

En la figura 37 se muestra una imagen de SEM del cultivo de *A. hydrophila* en las jarositas. La imagen evidencia la necesidad de las células del aislado de entrar en contacto directo con el mineral formando una biopelícula puesto que ambos, microorganismos y mineral, aparecen rodeados de material polimérico. En la imagen del residuo se pueden observar los cristales prismáticos característicos de la vivianita (Zachara et al., 2002).

La adquisición de hierro es un proceso de gran importancia para *A. hydrophila* en su medio acuático. Aunque el contacto directo parece ser el mecanismo principal para la transferencia de electrones, se sabe que las especies de *Aeromonas* producen dos sideróforos con gran afinidad por el hierro que contienen ácido 2,3-dihidroxibenzoico: la amonabactina y la enterobactina. La presencia de estos compuestos en el medio de cultivo explicaría la capacidad de *A. hydrophila* para mantener el ion ferroso producido en disolución.

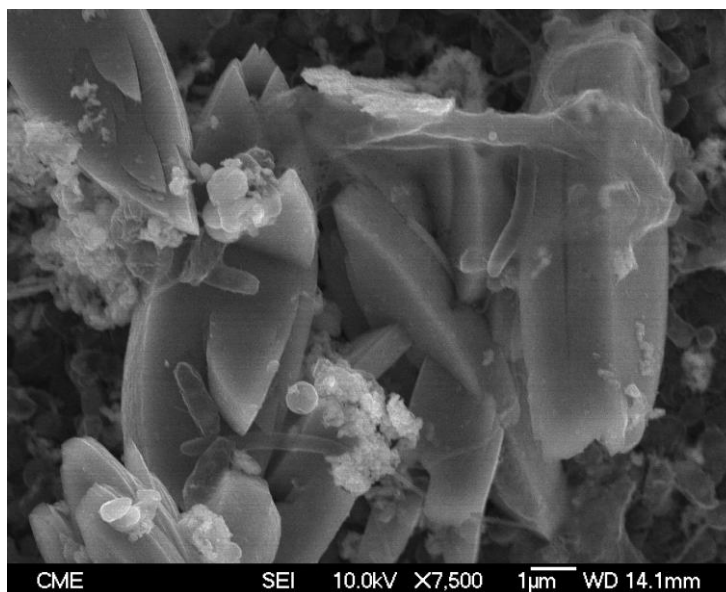


Figura 37. Imagen SEM de células de *A. hydrophila* unidas a la superficie de la jarosita transformada y su biopelícula.

El residuo generado por la acción bacteriana sobre la jarosita se analizó mediante DRX (Figura 38). Además de la jarosita que se suministró como fuente de hierro para *A. hydrophila*, se identificaron magnetita (óxido de hierro estequiométrico formado por una mezcla de hierro ferroso y férrico), y vivianita (fosfato de Fe(II)).

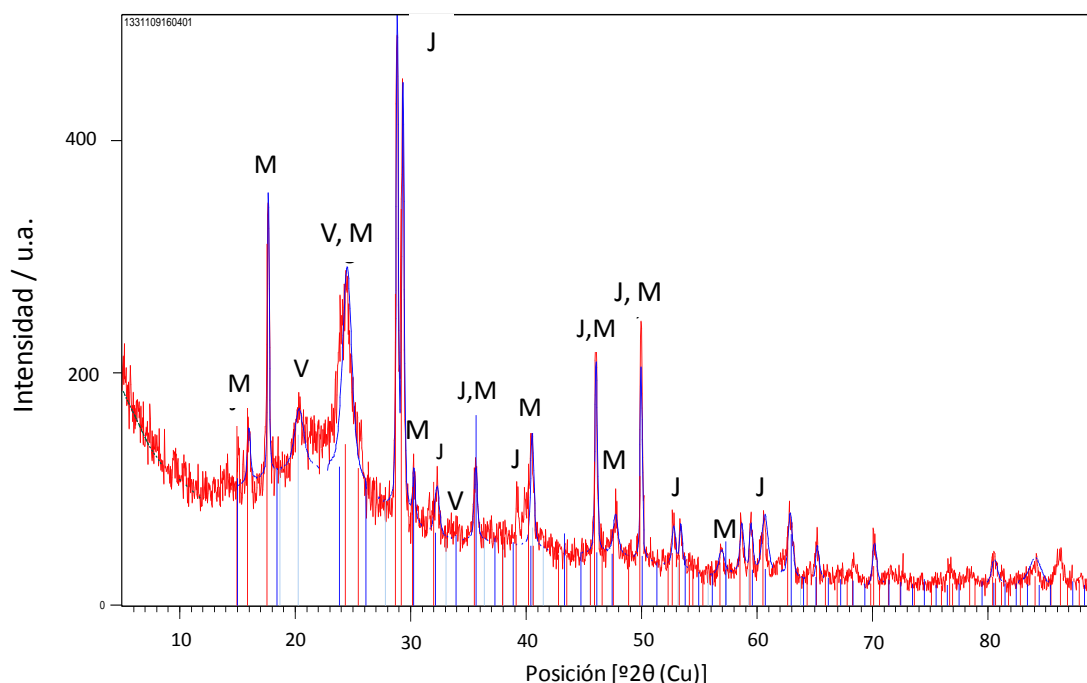


Figura 38. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y potasio con *A. hydrophila*. J = jarosita; M= magnetita; V = vivianita.

Con el fin conseguir una recuperación mayor de hierro para poder valorar el potencial de aplicación de la biolixiviación con este microorganismo a mayor escala, se llevó a cabo el proceso de biorreducción de las jarositas con la cepa de *A. hydrophila* de forma semicontinua. Los resultados obtenidos se compararon con los experimentos realizados en discontinuo (figura 39).

Los experimentos en semicontinuo se iniciaron en las mismas condiciones que los anteriores de biorreducción de jarositas en discontinuo, es decir, en viales con un volumen final de 60 ml de medio de cultivo y una concentración 60 mM de Fe(III), suministrado como jarositas de amonio y de potasio. Posteriormente, en cada toma de muestra, se extraían 20 ml de sobrenadante del cultivo que se reponían con medio Postgate C nuevo. La cantidad de Fe^{2+} en la fase acuosa generada en el experimento semicontinuo fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\sum_{i=0}^i [m(\text{Fe}^{2+} \text{ aq. inicial})_i - (m(\text{Fe}^{2+} \text{ aq. inicial})_{i+1} - m(\text{Fe}^{2+} \text{ aq. extraída en 20 ml})_{i+1})] \quad (14)$$

siendo i el día en el que se hacía la toma de muestra y se añadía el medio fresco.

La figura 39 pone de manifiesto que en el experimento semicontinuo se consiguió una solubilización de Fe^{2+} procedente del mineral insoluble muy superior a la conseguida en el experimento discontinuo. Una vez transcurridos 70 días del experimento, se lixiviaron 7 mg en el experimento discontinuo mientras que en el semicontinuo se extrajeron 41 mg. Estos resultados indican que el rendimiento del proceso en semicontinuo fue 8 veces mayor que en los ensayos discontinuos.

El bajo rendimiento del proceso discontinuo puede estar relacionado con la adsorción y/o precipitación de compuestos de Fe(II) sobre los minerales férricos o sobre la superficie de las células, que puede ocasionar una disminución de la actividad de las bacterias que llevan a cabo la reducción desasimilatoria de Fe(III). Este hecho también fue constatado por Urrutia en *Shewanella alga* (Urrutia et al., 1998). El cultivo en semicontinuo favorece la formación de ion ferroso por biorreducción, ya que se evita su concentración y precipitación al eliminarlo periódicamente del medio e incorporar nuevo medio fresco (Roden and Urrutia, 1999).

El hierro podría ser fundamental para muchas funciones de *A. hydrophila*. En consecuencia, necesitaría disponer de él y por ello secretaría los sideróforos que permiten mantenerlo en disolución. También puede ocurrir que al disminuir la concentración de Fe^{2+} en la fase acuosa, por dilución al añadir el medio fresco en los experimentos en semicontinuo, el hierro no se deposite sobre la célula o sobre el mineral evitando de esta manera la inhibición de la reducción. Así, la bacteria puede continuar solubilizando el hierro necesario para su desarrollo, se favorece su crecimiento y, en consecuencia, la biolixiviación del mineral.

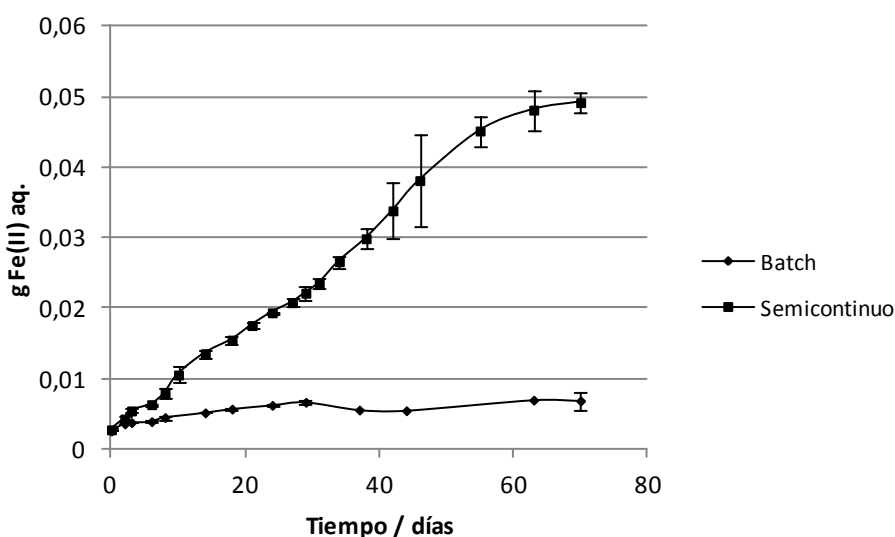


Figura 39. Comparación de la biolixiviación de las jarositas de amonio y de potasio en discontinuo y en semicontinuo con *A. hydrophila*.

d) Comparación de los resultados de biolixiviación reductora de jarositas de amonio y potasio con los distintos cultivos de bacterias hierro-reductoras

La comparación de las cinéticas de lixiviación de jarosita con los tres cultivos estudiados se muestra en la figura 40a. Como puede apreciarse, el consorcio microbiano y la cepa pura de *S. putrefaciens* generaron las cantidades más altas de Fe(II) , por reducción del Fe(III) contenido en el mineral, alcanzándose concentraciones de 2,3 y

2,9 g/l, respectivamente. No obstante, hay que resaltar que la velocidad de lixiviación y de reducción del ion férrico con el consorcio fueron mucho mayores que con *S. putrefaciens*. Con el cultivo natural la concentración de 2,3 g/l de Fe(II) se alcanzó en 10 días, mientras que con *S. putrefaciens* se necesitaron 30 días para lograr la misma concentración.

Por otro lado, la cepa pura de *A. hydrophila*, pese a ser capaz de reducir Fe(III), presentó la cinética de reducción de las jarositas más lenta entre todos los cultivos estudiados. El hecho de que esta especie reduzca con rapidez el ión férrico soluble, alcanzándose un 91,8 % de reducción en 3 días (apartado 4.1.2) y, sin embargo, su capacidad reducción de las fuentes de hierro insoluble sea mucho menor (13,9 % de reducción en 44 días), pone de manifiesto la dificultad de transferencia de electrones entre la célula y el mineral.

En la figura 40b se compara la cantidad de ion ferroso que los diferentes cultivos son capaces de mantener en disolución como consecuencia del ataque de la jarosita. Esta característica es muy interesante desde el punto de vista de las aplicaciones tecnológicas de la biolixiviación anaerobia para recuperar el hierro u otros metales de valor embebidos en la matriz del mineral.

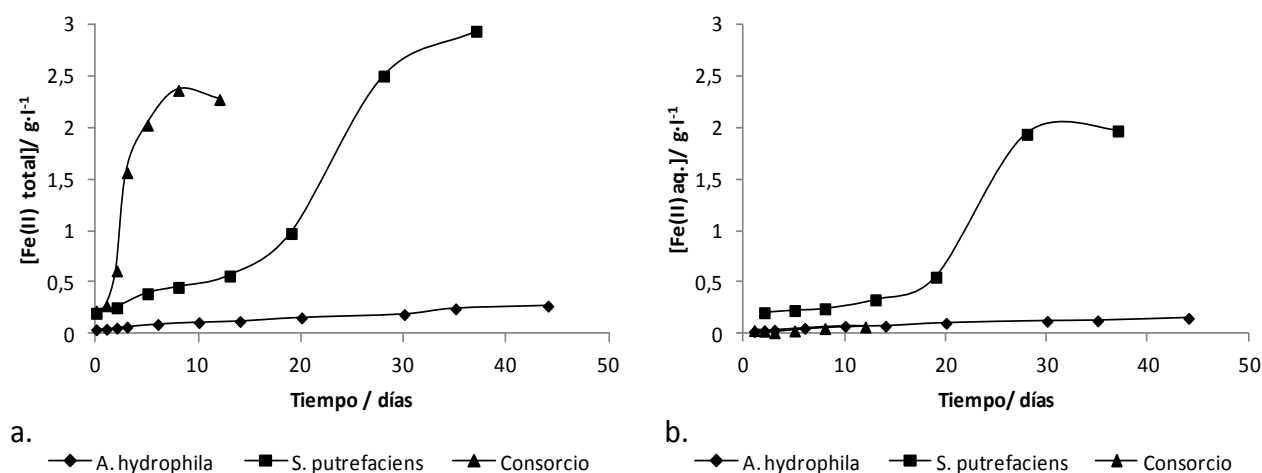


Figura 40. (a) Comparación de la cinética de reducción del Fe(III) y (b) de disolución del Fe(II), por lixiviación de jarositas de amonio y potasio con los diferentes cultivos.

Cabe destacar que, a pesar de la alta velocidad de reducción del Fe(III) con el consorcio natural, este cultivo no fue capaz de mantener el ion ferroso en la fase acuosa y prácticamente todo el Fe(II) precipitó y pasó a formar parte del residuo sólido. Como se explicó anteriormente (apartado 4.2.1), la coexistencia de especies sulfato-reductoras junto con las especies hierro-reductoras en este cultivo mixto conlleva la precipitación de sulfuros de Fe(II) por reducción simultánea del sulfato y del ión férrico del mineral.

Por último, es importante señalar que *A. hydrophila* y *S. putrefaciens* fueron capaces de mantener en disolución el Fe(II) generado por biorreducción. Puesto que la velocidad de reducción de la jarosita con *A. hydrophila* fue la más baja de los tres cultivos ensayados, la cantidad de Fe(II) en la fase acuosa del cultivo de *A. hydrophila*, aunque creciente, fue mucho menor que en el cultivo de *S. putrefaciens*. Por este motivo, con esta bacteria se realizaron experimentos en semicontinuo que estimularon la disolución del ion ferroso como se puso de manifiesto en la figura 39. Los mejores resultados, tanto de biolixiviación de las jarositas como de solubilización del Fe(II), se obtuvieron con el cultivo puro de *S. putrefaciens*. Como refleja la figura 40b, esta cepa disuelve una gran parte del hierro férrico suministrado como sustrato sólido y, al mismo tiempo, es capaz de mantener en disolución hasta una concentración de 2 g/l del Fe²⁺ producido.

En la tabla 9 se recogen, a modo de resumen, los resultados más destacados de los estudios de biolixiviación de jarositas mediante el ataque microbiano. La tabla permite la comparación de las cantidades finales de hierro reducido y solubilizado en los diferentes cultivos. Asimismo, incluye los productos minerales resultantes de la acción microbiana poniendo de manifiesto la importancia de estos microorganismos en el ciclo del hierro y del azufre en ambientes anóxicos.

Tabla 9. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de biolixiviación reductora de jarositas. Cantidad de Fe(III) inicial suministrada como jarosita de amonio y potasio ($\text{NH}_4\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, $\text{KFe}_2(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$): 60 mM, 3,35 g/l.

	$[\text{Fe}^{2+}]_{\text{aq.}} / \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	$[\text{Fe(II)}]_{\text{f}} / \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	% Fe(II) soluble	% Fe(III) transformado	Composición del residuo
Cultivo natural	0,1	2,4	0,5	68,2	Sulfuro de hierro FeS Vivianita $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ Siderita FeCO_3
<i>S. putrefaciens</i>	2,0	2,9	58,4	86,9	Magnetita Fe_3O_4 Vivianita $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ Siderita FeCO_3
<i>A. hydrophila</i>	0,2	0,3	7,9	13,9	Magnetita Fe_3O_4 Vivianita $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$

4.2.2. Biolixiviación reductora de argentojarosita

La jarosita de plata fue sintetizada químicamente mediante el método de May (May et al., 1973), detallado en la parte experimental. La argentojarosita, junto con la plumbojarosita, son los minerales de este grupo con mayor valor económico por su contenido en metales valiosos. En la figura 41a y 41b se muestran imágenes FE-SEM de la argentojarosita utilizada en los ensayos de biorreducción junto con un análisis EDX del material sin atacar (Figura 41c). El análisis por difracción de rayos X confirmó la composición y estructura cristalina de la argentojarosita siendo su fórmula química $\text{AgFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ (Figura 41d). Este difractograma se utilizó como referencia para analizar los cambios mineralógicos que experimentó el mineral cuando se lixivió con los diferentes cultivos bacterianos.

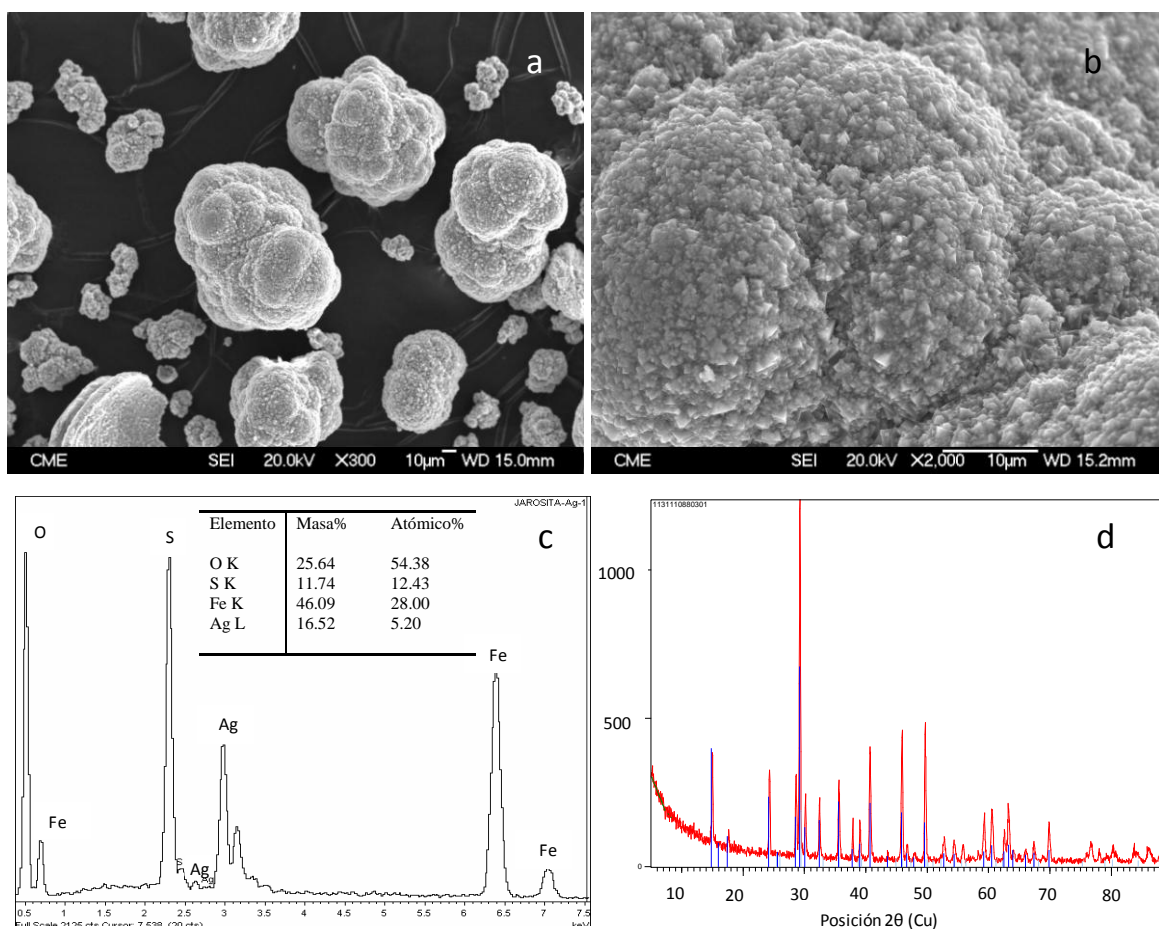


Figura 41. Caracterización de la argentojarosita sintética utilizada en los ensayos de biolixiviación reductora. (a, b) Micrografías FE-SEM de electrones secundarios, (c) análisis EDX y (d) difractograma de rayos X.

El estudio de la biolixiviación reductora de la argentojarosita se realizó con el fin de determinar el potencial de aplicación de este proceso a la extracción de plata a partir de minerales refractarios de baja ley.

Con este objetivo, se realizaron ensayos de lixiviación con los tres cultivos microbianos, el consorcio natural, *S. putrefaciens* y *A. hydrophila*, siendo la argentojarosita el mineral usado como único aceptor de electrones. La transformación de la jarosita de plata por la acción de los microorganismos se evidenció por el cambio de color que experimentó el residuo generado en los distintos experimentos, como se puede apreciar en la figura 42. Inicialmente, la jarosita de plata tiene un color amarillo intenso. Tras 15 días de ataque microbiano el residuo mineral en los cultivos puros de *S. putrefaciens* y *A. hydrophila* presenta el color verdoso característico del ión ferroso, y en el caso del consorcio natural se aprecia el color negro característico de los sulfuros que indica la presencia de bacterias con actividad sulfatorreductora.

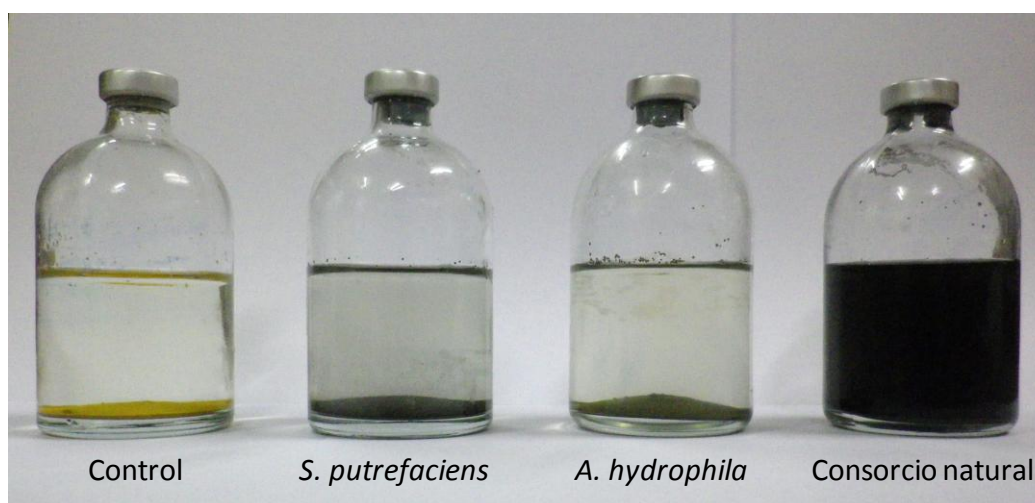


Figura 42. Ensayos de biorreducción de jarosita de plata: control abiótico y medios inoculados con los distintos cultivos bacterianos.

a) Biolixiviación con el consorcio natural

La transformación de la argentojarosita por biolixiviación reductora, se siguió a través de la formación de Fe(II), puesto que es el producto resultante de la respiración metabólica de los microorganismos que emplean el hierro férrico de la jarosita. Los

resultados correspondientes al porcentaje de Fe(II), total y en disolución, junto con la evolución de la población celular durante el experimento, se muestran en la figura 43a. Como puede comprobarse, el consorcio microbiano natural redujo en 6 días de incubación un porcentaje superior al 80% del hierro suministrado como jarosita de plata. El rendimiento de reducción de Fe(III) y de formación de Fe(II) fue superior al obtenido en la reducción de las jarositas de amonio y potasio con el consorcio natural. Este hecho pudo comprobarse al comparar estos resultados con los reflejados en la figura 29. Sin embargo, tampoco en este caso el ion ferroso se mantuvo en la disolución sino que se incorporó al precipitado. La toxicidad de los iones de plata sobre un gran número de bacterias es un hecho bien conocido (Liu et al., 2010; Shinde et al., 2012). No obstante, el cultivo del consorcio natural no se vio afectado durante el proceso de lixiviación como lo demuestra la elevada concentración de células presentes en el ensayo. Los resultados de la evolución de la población celular indican que la velocidad de crecimiento bacteriano transcurrió paralela a la velocidad de producción de ion ferroso (Figura 43a).

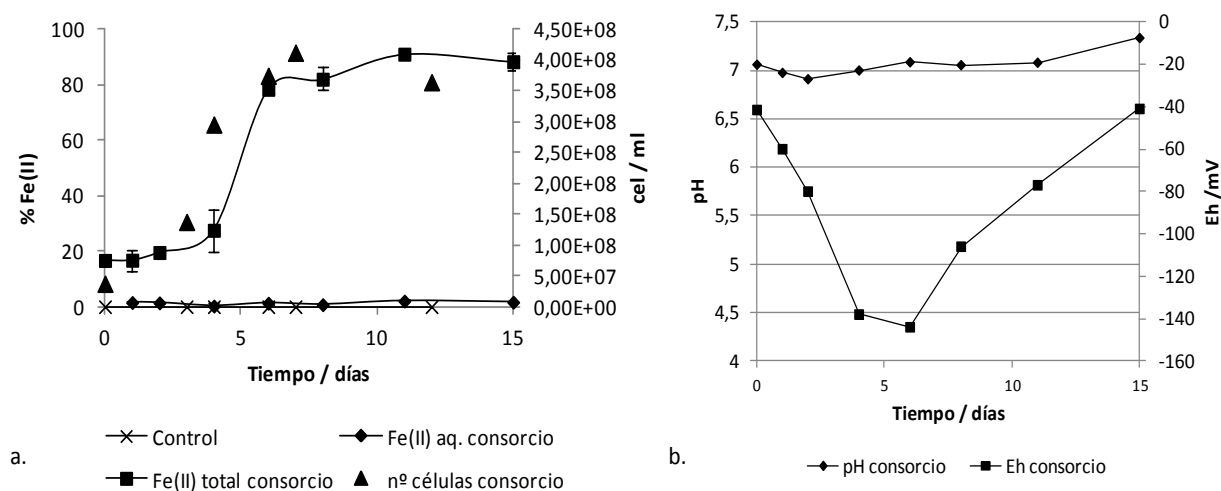


Figura 43. Biolixiviación de argentojarosita con el consorcio natural. (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y de la población celular. (b) Variación del pH y del potencial durante el ensayo.

La figura 43b refleja la evolución del pH y del potencial a lo largo del ensayo de biorreducción con el consorcio natural. El pH del cultivo se mantuvo en torno a la neutralidad o aumentó ligeramente. Como ya se ha explicado con anterioridad, las

bacterias sulfato-reductoras producen OH^- y CO_2 durante la oxidación del lactato y la reducción del sulfato que propician este comportamiento (reacción 11).



En lo que se refiere a la evolución del potencial redox, éste experimentó importantes variaciones a lo largo del ensayo. En primer lugar, el potencial decreció hasta alcanzar el valor mínimo, -150 mV, en 6 días de reacción. Precisamente, en este periodo se alcanzó el máximo porcentaje de reducción, por tanto, el descenso del potencial se explica por el aumento inicial de la concentración de ion ferroso en la disolución de acuerdo con la ecuación de Nerst (2). Posteriormente, tuvo lugar un incremento del potencial probablemente originado por la precipitación del ión ferroso.

El residuo generado por lixiviación de la argentojarosita con el consorcio natural fue observado mediante SEM y las imágenes de electrones secundarios y de electrones retrodispersados se presentan en la figura 44. Con los electrones secundarios se obtiene una imagen tridimensional de la muestra. Por otro lado, la intensidad de emisión de los electrones retrodispersados depende del número atómico medio de los átomos de la muestra, así los átomos más pesados producen mayor cantidad de electrones retrodispersados. La imagen originada por los electrones retrodispersados reveló diferencias en la composición química de los componentes del residuo correspondiendo las áreas más brillantes a fases sólidas con concentraciones de plata más altas.

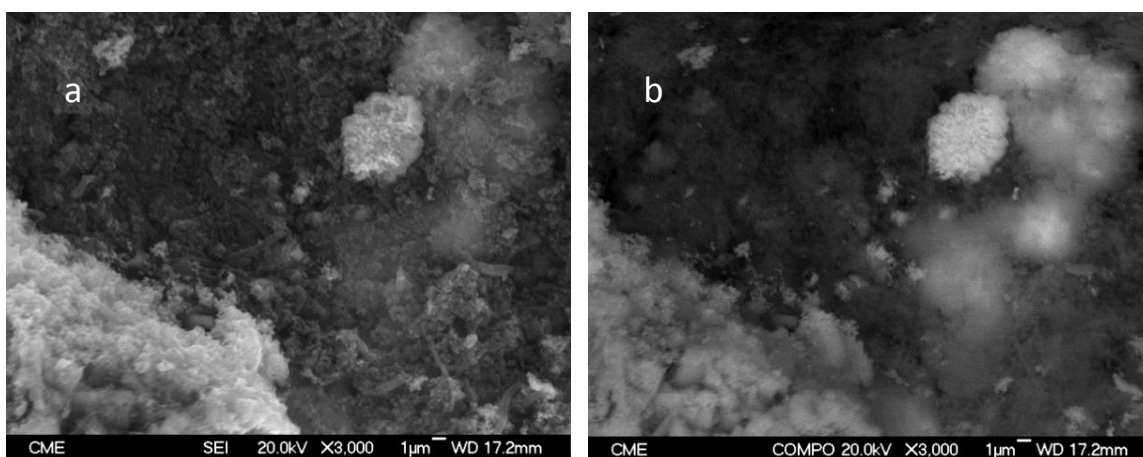
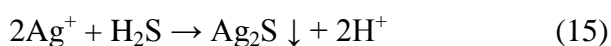


Figura 44. Micrografías FE-SEM de (a) electrones secundarios y (b) retrodispersados del residuo de argentojarosita lixiviada con el consorcio natural.

El residuo de biolixiviación también se analizó mediante DRX y en la figura 45 se muestra el difractograma correspondiente. El precipitado obtenido, de color negro, indicó la presencia de sulfuros. Se identificaron, además de la argentojarosita que no fue atacada por los microorganismos, otros minerales. La siderita se formó por precipitación del ion ferroso con el carbonato procedente del metabolismo del lactato. También se identificó la vivianita, un fosfato de Fe(II), y sulfuro de plata, generado por la presencia de bacterias sulfato-reductoras como ya se había puesto de manifiesto en la reducción de jarositas de amonio y de potasio. Los sulfuros biogénicos son generalmente muy insolubles y precipitan fácilmente con metales pesados.



La acción de las bacterias sulfato-reductoras hace que el sulfuro generado por reducción del sulfato pueda precipitar e inmovilizar fácilmente los metales pesados presentes en los vertidos de aguas residuales, por lo que estos microorganismos se suelen utilizar en la biorremediación de dichos efluentes.

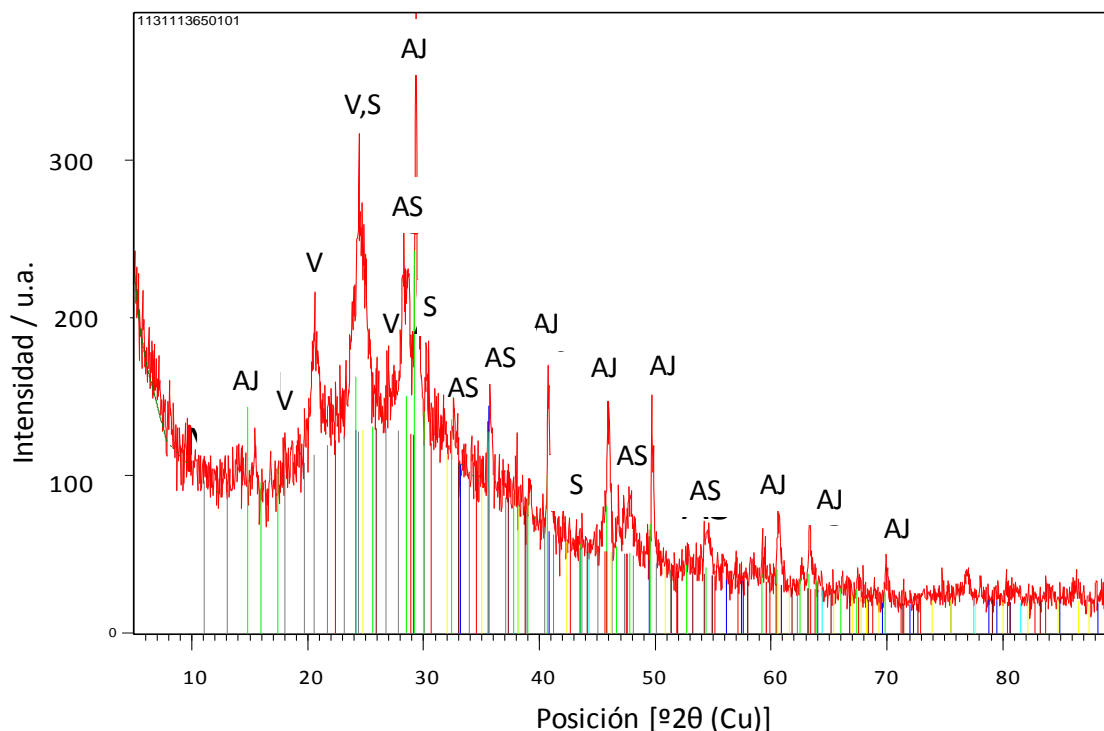


Figura 45. Difractograma de rayos X del residuo de la argentojarosita atacada por el consorcio natural. AJ = argentojarosita; S = siderita; V = vivianita; AS = sulfuro de plata.

Este proceso de precipitación de sulfuros mediante bacterias sulfato-reductoras tiene como ventaja destacable la posibilidad de recuperar metales valiosos contenidos en los sulfuros precipitados. En este caso, la plata se concentra en el precipitado y, dado su valor en el mercado, su recuperación a partir del residuo puede aportar valor añadido al proceso.

b) Biolixiviación con *Shewanella putrefaciens*

El cultivo puro de *S. putrefaciens* exhibió un comportamiento muy diferente al del consorcio natural. La capacidad de reducción del Fe(III) por esta bacteria fue inferior a la obtenida con dicho consorcio, siendo el porcentaje máximo de Fe(II) de aproximadamente el 9%, en 15 días de incubación (Figura 46a). Otra diferencia importante reside en que esta cepa fue capaz de mantener en disolución gran parte del ion ferroso producido.

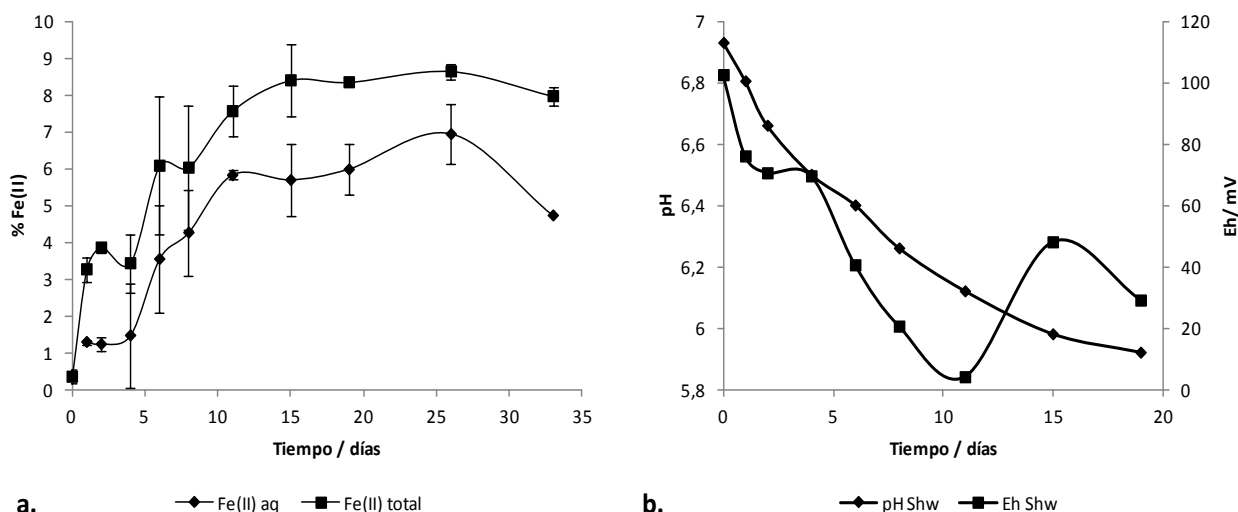


Figura 46. Biolixiviación de argentojarosita con *S. putrefaciens*. (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el ensayo.

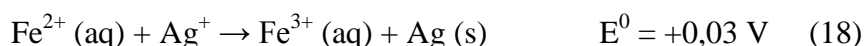
Los cambios geoquímicos en el medio inoculado durante el proceso de biorreducción se siguieron mediante la medida de los valores de pH y potencial redox y se muestran en la figura 46b. El pH disminuyó desde un valor de 6,9 hasta 5,9 como consecuencia,

probablemente, de una pérdida de la capacidad tamponante de la disolución. Esta acidificación del pH del medio justifica que el ion ferroso pueda mantenerse disuelto y no precipite como ocurría con el consorcio natural en el que el pH se mantenía neutro durante todo el ensayo.

El potencial redox en los viales inoculados con *S. putrefaciens* disminuyó hasta alcanzar el mínimo en 11 días de incubación coincidiendo con el máximo valor de hierro reducido. Posteriormente, el potencial redox aumentó, indicando una disminución de la relación Fe(II)/Fe(III) en la disolución. Este incremento del potencial podría ser debido a una reacción de cementación de los iones de plata por el ion ferroso del medio de reacción. Las semirreacciones implicadas son:



Siendo la reacción global de cementación:



donde el Fe^{2+} en disolución, generado por bio-reducción del Fe(III) contenido en la jarosita, es el reductor y el catión Ag^{+} , resultante de la lixiviación de la argentojarosita, es el oxidante.

Las micrografías de SEM del residuo de la argentojarosita atacada por *S. putrefaciens* que se muestran en la figura 44 evidenciaron que el mineral no había sido atacado completamente ya que se puede apreciar su morfología cristalina original. La imagen de electrones retrodispersados de la misma zona del residuo permitió observar unos puntos brillantes (señalados por flechas en la figura 44b) entre las partículas de jarosita de plata que no habían sido atacadas. Las bacterias se sitúan directamente sobre el mineral sin transformar (Figura 44c). Las zonas brillantes del residuo, visualizadas con la imagen de electrones retrodispersados (figura 44b), se corresponderían con productos con un alto contenido de plata, ya que este es el elemento de mayor masa atómica de todos los presentes en el mineral. Una observación detallada de estas partículas (Figura 44d) junto con su análisis elemental EDS puso de manifiesto que se trataba de nanopartículas con la siguiente composición: 71% Ag, 11 % S, 16 % O y 2 % Fe.

Las investigaciones anteriores sobre la biolixiviación de jarosita de plata con *S. putrefaciens* sugieren la formación intracelular de nanopartículas de plata con el fin de mitigar la elevada toxicidad de este metal. La bacteria reduciría y bioacumularía la plata en el interior de la célula. La presencia de nanopartículas de plata en el exterior de las células se explicaría por su liberación tras la muerte celular (Weisener et al., 2008). No obstante, las oscilaciones observadas en el potencial redox sugieren la posibilidad de que simultáneamente tenga lugar un proceso de cementación en el que se forma plata metálica extracelularmente y de forma abiótica.

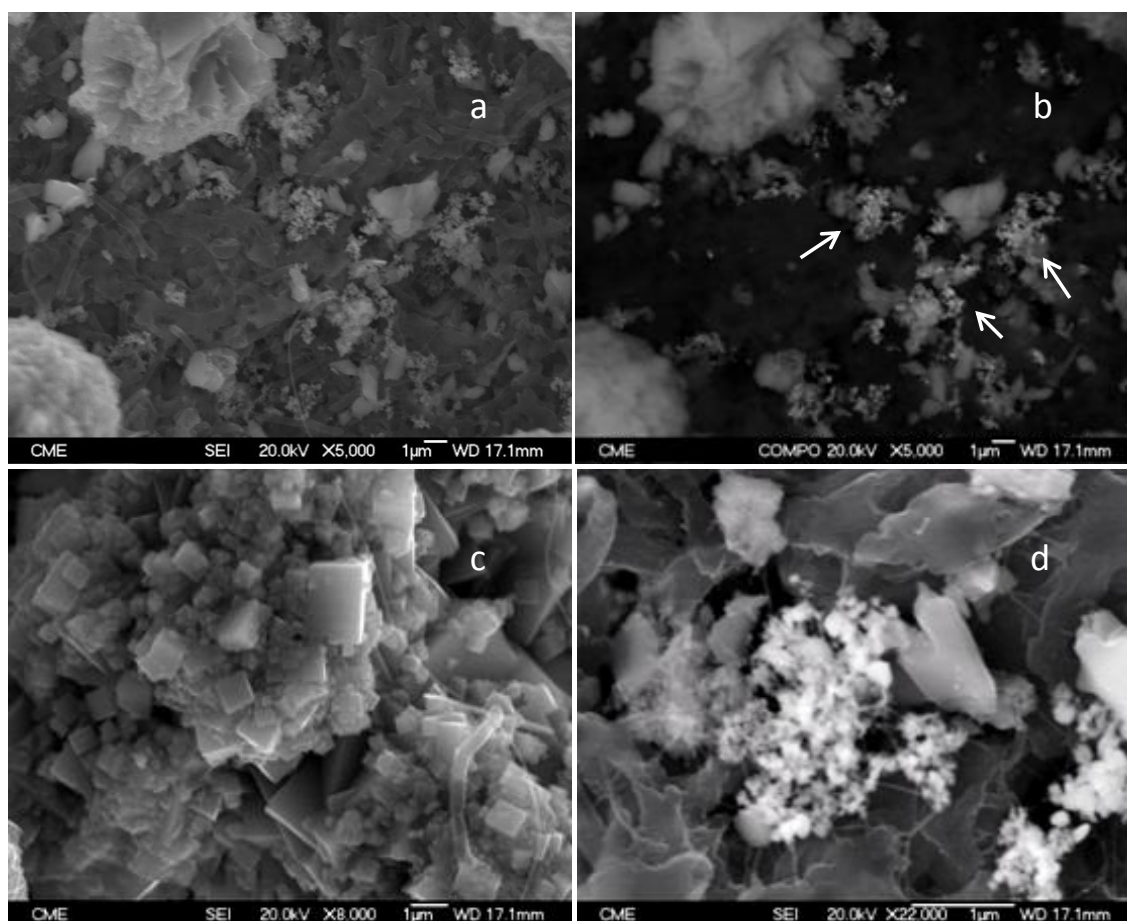
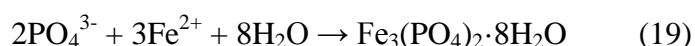


Figura 47. Micrografías FE-SEM de (a) electrones secundarios y (b) electrones retrodispersados del residuo de la argentojarosita atacada por *S. putrefaciens*. (c) Detalle de las células sobre el mineral de jarosita de plata. (d) Detalle de las nanopartículas de plata formadas en el proceso de biolixiviación reductora.

El análisis por difracción de rayos X del residuo sólido del mineral atacado por *S. putrefaciens* permitió la identificación principalmente de plata metálica y vivianita

($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), como se pone de manifiesto en la figura 48. También se observaron picos correspondientes a la jarosita de plata sin atacar y a la siderita.

La siderita es un carbonato de Fe(II) que se forma por la presencia de carbonatos procedentes de la oxidación microbiana del lactato. La vivianita es un fosfato de Fe(II) cuya precipitación puede deberse a la reacción del fosfato del medio con el ion ferroso producido por las bacterias. Su formación en presencia de *S. putrefaciens* también podría deberse a que esta especie utiliza flavinas que pueden estar unidas a grupos fosfato, como el flavin-adenín-dinucleótido (FAD) que interviene en reacciones metabólicas de oxidación-reducción, y que actúan como lanzadera de electrones entre la célula y el mineral insoluble (Brutinel and Gralnick, 2012; Marsili et al., 2008; von Canstein et al., 2008). Las flavinas se acumulan en el medio de cultivo de las especies de *Shewanella*, lo que puede suponer una fuente adicional de fosfatos para estas bacterias. La presencia de ion ferroso en el medio procedente de la biorreducción y las condiciones de pH y potencial permitieron la precipitación del fosfato como vivianita (reacción 19).



Por otro lado, se confirmó la naturaleza de las nanopartículas biosintetizadas por *S. putrefaciens*. La presencia de plata elemental sugiere que la Ag(I) de la argentojarosita podría servir como aceptor electrónico terminal junto con el Fe(III), siendo reducida a Ag(0). Hay, al menos, dos explicaciones posibles: un beneficio metabólico para la bacteria o una estrategia para evitar la toxicidad de los iones de plata. No obstante, el rendimiento energético obtenido de la reducción de Ag(I) a Ag(0) es insignificante frente al de la reducción de Fe(III) lo que sugiere que este segundo proceso sería más plausible.

La posibilidad de obtener nanopartículas de plata por biosíntesis en este proceso de lixiviación con bacterias reductoras de hierro abre nuevas expectativas de aplicación de estos microorganismos.

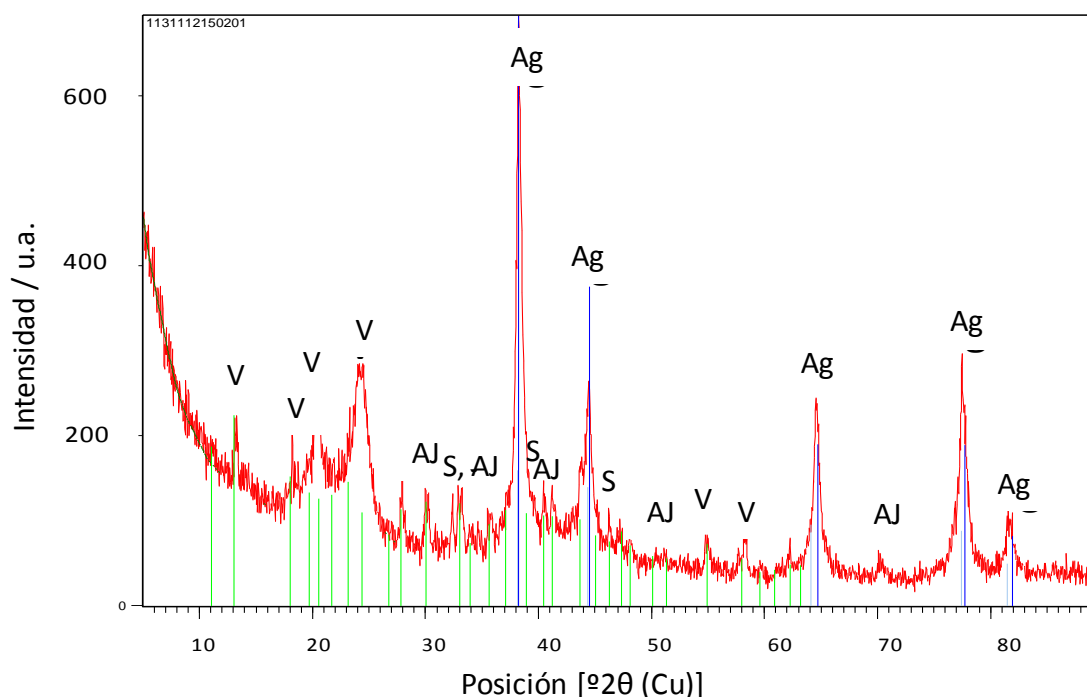


Figura 48. Difractograma de rayos X del residuo de la argentojarosita atacada por el cultivo de *S. putrefaciens*. V = vivianita; S = siderita; AJ = jarosita de plata; Ag = plata metálica.

En la actualidad, muchos investigadores han centrado su atención en la producción de nanopartículas de plata debido a sus aplicaciones potenciales. Con motivo de sus propiedades antibacterianas, estas nanopartículas se utilizan en diferentes campos como la medicina y en varias industrias como la textil o la cosmética.

Los bioprocesos de síntesis de nanopartículas ofrecen las ventajas de ser respetuosos con el medio ambiente y la posibilidad de llevarlos a cabo a gran escala (Gade et al., 2010). Los hongos y las plantas son capaces de reducir iones metálicos formando nanopartículas de distintos tamaños y morfologías (Kumar et al., 2010; Syed et al., 2013). No obstante, hay muy pocos estudios de biosíntesis de nanopartículas de plata utilizando bacterias debido al efecto antimicrobiano de este elemento. Algunos ejemplos de especies que producen nanopartículas son *Brevibacterium casei*, *Bacillus subtilis* y *Stenotrophomonas* (Kalishwaralal et al., 2010; Malhotra et al., 2013; Reddy et al., 2010). Todas ellas reducen la plata a su estado elemental con el fin de neutralizar la toxicidad de los iones Ag^+ .

c) Biolixiviación con *Aeromonas hydrophila*

El aislado *A. hydrophila* también fue capaz de utilizar el Fe(III) presente en la jarosita de plata como fuente de ion férrico para la respiración.

En la figura 49a se muestra la cantidad de hierro ferroso producido y solubilizado por el cultivo puro de *A. hydrophila*. Esta bacteria fue capaz de reducir un 4% del Fe(III) suministrado como jarosita de plata durante el tiempo de ensayo. Cabe destacar que la velocidad de reducción y el rendimiento de la reducción fueron bajos comparados con los cultivos del consorcio natural y de *S. putrefaciens*. Además, con *A. hydrophila* solo el 0,8% del ferroso generado a partir del hierro suministrado como argentojarosita se mantiene en disolución.

La justificación de los resultados obtenidos puede encontrarse precisamente en la capacidad de esta cepa de disolver la red cristalina de la argentojarosita con la consecuente liberación de los iones de plata a la disolución. Los iones de plata tienen efecto tóxico para los microorganismos por lo que este podría ser probablemente el factor limitante de la biorreducción del mineral de plata. La toxicidad permite explicar la fuerte disminución del número de células en el sobrenadante transcurridos 3 días.

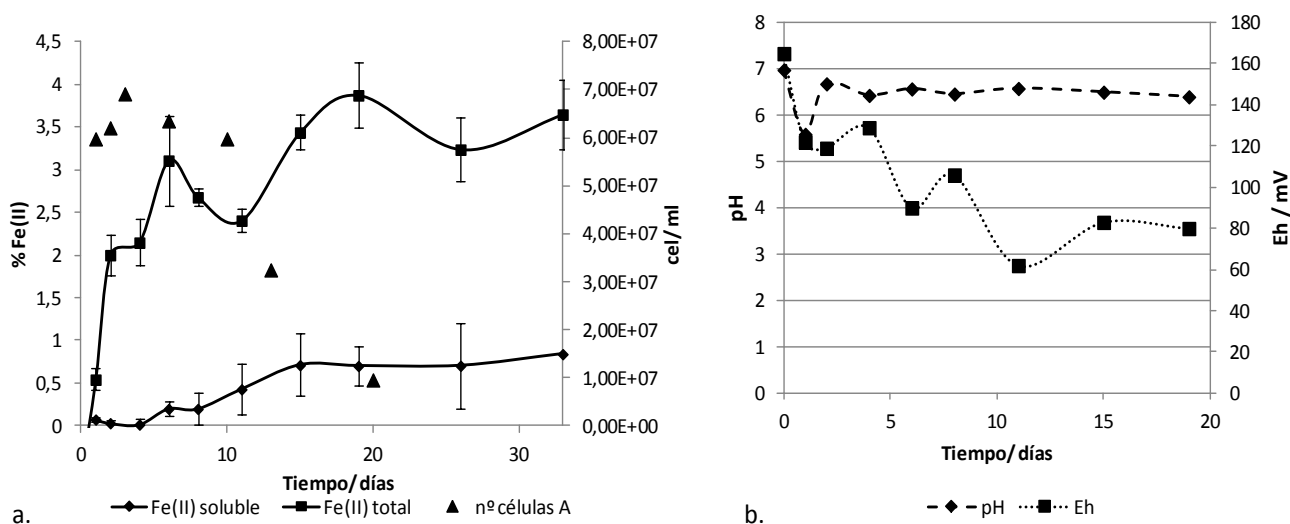
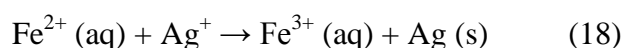


Figura 49. Biolixiviación de argentojarosita con *A. hydrophila*. (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y de la población celular. (b) Variación del pH y del potencial durante el ensayo.

El estudio de la evolución del pH en los viales inoculados con *A. hydrophila* que se recoge en la figura 49b indica que se mantiene prácticamente constante a lo largo del tiempo en un valor de 6,8. Sin embargo, la figura también pone de manifiesto que el potencial redox experimentó fluctuaciones durante el experimento. Estas oscilaciones coincidieron con las observadas en la evolución de la concentración Fe(II) en el medio. En primer lugar, se produjo una disminución inicial del valor del potencial del medio vinculada a la respiración bacteriana, es decir, a la biorreducción del Fe(III) del mineral con el correspondiente aumento de la concentración de Fe(II) en la disolución. A continuación, se sucedieron una serie de oscilaciones del potencial que podrían ser explicadas por el proceso abiótico de cementación de los iones de plata por el hierro ferroso.



La observación de la jarosita de plata del vial inoculado con *A. hydrophila* mediante SEM muestra la presencia de bacterias sobre la superficie del mineral, adheridas mediante unos filamentos extracelulares (Figura 50). Además, se pudo apreciar que la superficie de la argentojarosita aparece poco atacada, sólo se observa una transformación superficial del mineral en algunas zonas y la mayoría de las partículas minerales conservan su aspecto cristalino original. Las flechas rojas en la figura 50 señalan bacterias con una gran cantidad de depósitos en la superficie que podrían ser plata metálica reducida, como se había apuntado anteriormente, con el fin de disminuir su toxicidad.

El análisis del residuo de la jarosita de plata atacada por *A. hydrophila* mediante DRX muestra un difractograma (Figura 51) muy similar al de la argentojarosita sin atacar (Figura 41d). Esto puso de manifiesto la dificultad del aislado bacteriano para crecer utilizando este mineral como fuente de hierro, como ya se había evidenciado en los análisis del Fe(II) producido y en las observaciones de SEM. Los productos principales de la respiración anaerobia de la bacteria son la vivianita y la magnetita. Además, se detectó la existencia de plata metálica que podría corresponder a los precipitados formados en la superficie de las células.

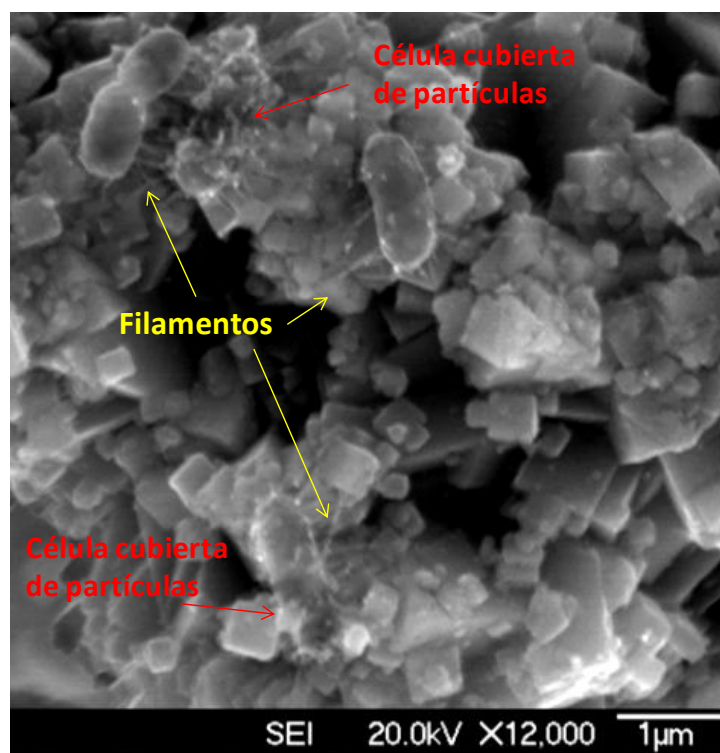


Figura 50. Imagen de FE-SEM de electrones secundarios del residuo de la argentojarosita atacada por *A. hydrophila*.

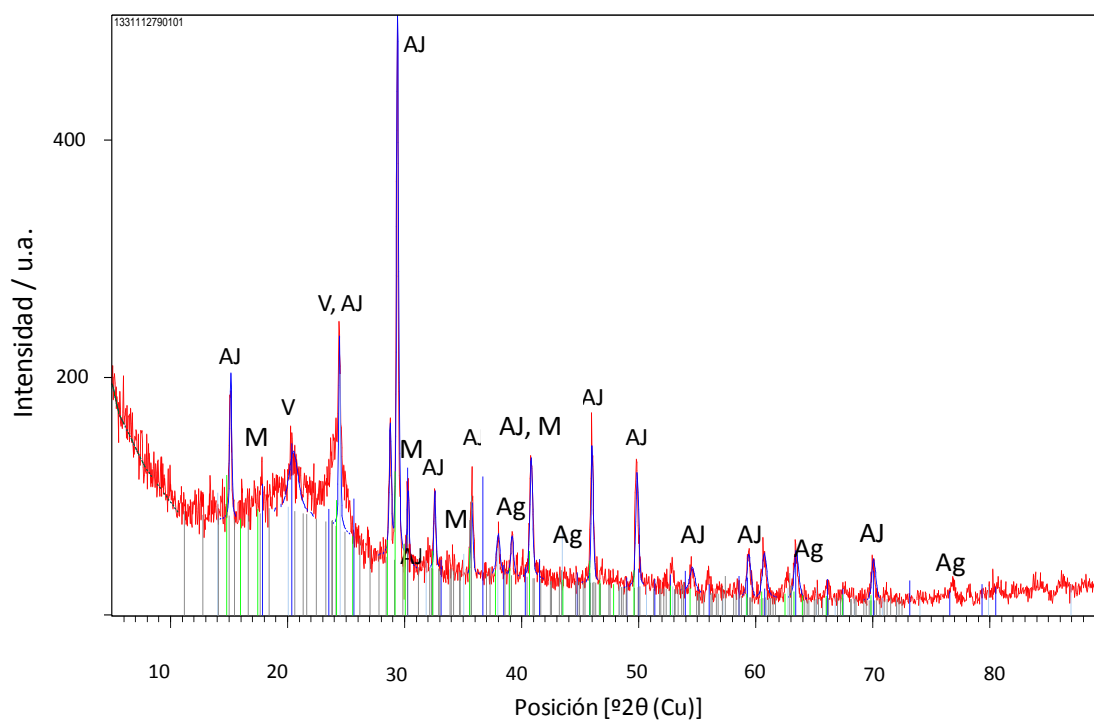


Figura 51. Difractograma de rayos X del residuo de la argentojarosita atacada por el cultivo de *A. hydrophila*. AJ = argentojarosita; V = vivianita; Ag = plata metálica; M = magnetita.

d) Comparación de los resultados de biolixiviación reductora de argentojarosita con los distintos cultivos de bacterias hierro-reductoras

Al comparar el comportamiento de los diferentes cultivos estudiados al suministrar la argentojarosita como fuente de Fe(III), se pusieron de manifiesto importantes diferencias.

El consorcio microbiano natural fue el único que redujo grandes cantidades de hierro alcanzándose una concentración de Fe(II) de 2 g/l. *S. putrefaciens* y *A. hydrophila* redujeron cantidades muy inferiores de hierro, observándose un comportamiento levemente mejor en *S. putrefaciens* (Figura 52a).

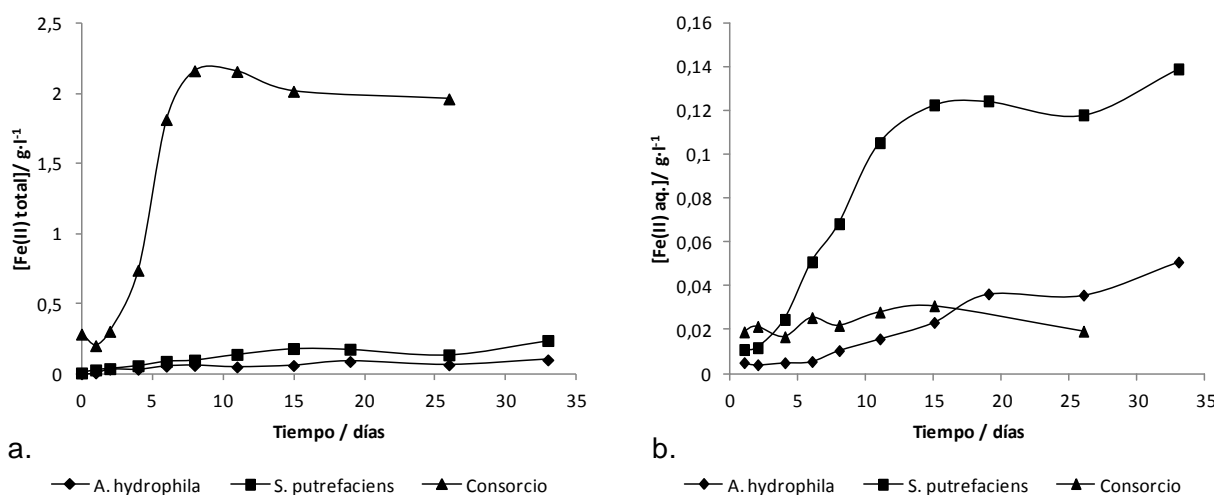


Figura 52. Comparación de la reducción y solubilización del hierro con los diferentes cultivos microbianos usando 60 mM de Fe suministrado como argentojarosita. Comparación de la cinética: (a) de reducción de jarosita y (b) de solubilización de Fe (II).

Pese a que el consorcio microbiano lleva a cabo una reducción rápida y eficaz de la argentojarosita, el Fe(II) y la plata del medio precipitan formando sulfuros metálicos. Probablemente, la precipitación de la plata hace que su toxicidad no influya en el crecimiento del cultivo.

Desafortunadamente, tanto *A. hydrophila* como *S. putrefaciens*, que son las cepas capaces de mantener parte del Fe^{2+} en la fase acuosa, como se puede apreciar en la figura 52b, alcanzaron rendimientos muy bajos de reducción cuando la argentojarosita estuvo presente en el medio como único aceptor de electrones. La justificación de los resultados obtenidos puede encontrarse precisamente en la capacidad de estos cultivos puros de disolver la red cristalina de la argentojarosita con la consecuente liberación de los iones de plata a la disolución. Esto conllevaría un efecto tóxico para los microorganismos por lo que podría ser probablemente el factor limitante para la biorreducción del mineral de plata.

Los resultados obtenidos sugieren que el grado de transformación de la argentojarosita por el cultivo bacteriano de *S. putrefaciens* fue más significativo que el producido por *A. hydrophila*. Mientras que *S. putrefaciens* desarrolló una estrategia de detoxificación a través de la reducción y bioacumulación de plata en forma de nanopartículas, *A. hydrophila* atacó la jarosita de plata de forma más superficial.

En la tabla 10 se resumen los resultados más significativos de los estudios de biolixiviación de jarosita de plata mediante el ataque microbiano. La tabla permite la comparación de las cantidades finales de hierro reducido y solubilizado en los diferentes cultivos. Asimismo, incluye los productos minerales resultantes de la acción microbiana poniendo de manifiesto la posible aplicación de estos microorganismos en bioprocesos de recuperación de plata.

Tabla 10. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de biolixiviación reductora de argentojarosita. Cantidad inicial de Fe(III) suministrada como jarosita de plata ($\text{AgFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$): 60 mM, 3,35 g/l .

	$[\text{Fe}^{2+}]_{\text{aq.}} / \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	$[\text{Fe(II)}]_{\text{t}} / \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	% Fe(II) soluble	% Fe(III) transformado	Composición del residuo
Cultivo natural	0,01	2,1	1,6	88,4	Vivianita Sulfuro de plata
<i>S. putrefaciens</i>	0,1	0,2	6,9	8,6	Vivianita Plata metálica
<i>A. hydrophila</i>	0,05	0,1	0,5	3,7	Magnetita Vivianita Plata

4.2.3. Biolixiviación reductora de mineral de gossan de Río Tinto

El gossan de Río Tinto (Huelva, España) está constituido fundamentalmente por goethita, hematita, cuarzo y varias especies de jarositas; la mayoría de ellas son soluciones sólidas. Además, este mineral contiene 1,0-2,5 g Au/t y 50-70 g Ag/t, por lo tanto, su lixiviación tiene interés por la posibilidad de concentrar y recuperar los metales valiosos (Sánchez et al., 1996; Viñals et al., 1995).

La figura 53 muestra la caracterización mediante SEM/EDS del mineral natural que se utilizó en los experimentos de biorreducción. El análisis químico reveló que los principales componentes del mineral son hierro, silicio, azufre, potasio, arsénico y aluminio.

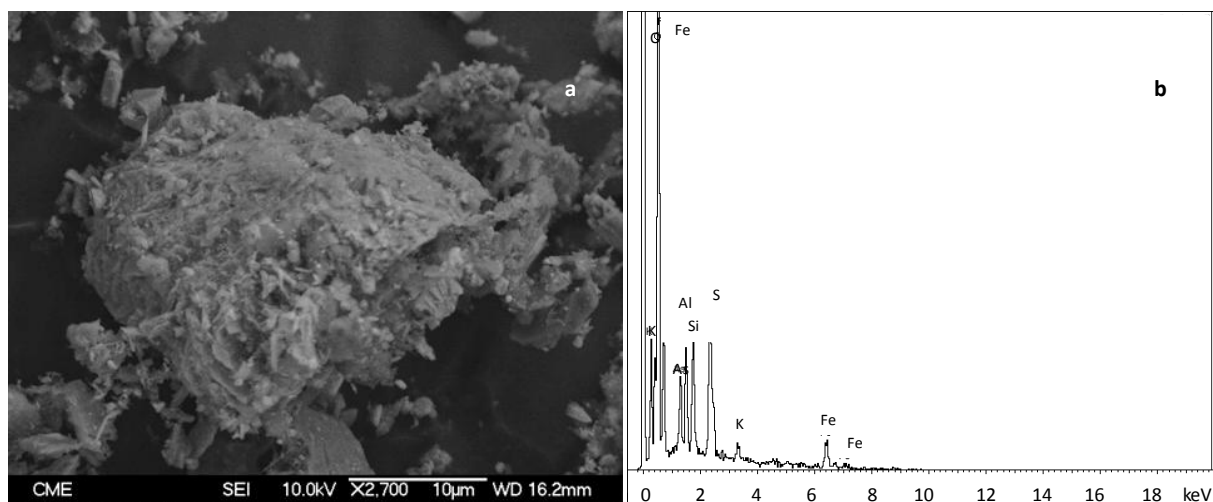


Figura 53. Caracterización del mineral gossan. (a) Micrografía FE-SEM de electrones secundarios y (b) análisis EDX del mineral gossan de Río Tinto utilizado en los ensayos de biorreducción.

El análisis por DRX para conocer la composición mineralógica de la muestra de gossan indicó la presencia de goethita, hematita, cuarzo y de otras fases minerales con hierro férrico como diferentes especies de jarositas, $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ (figura 54).

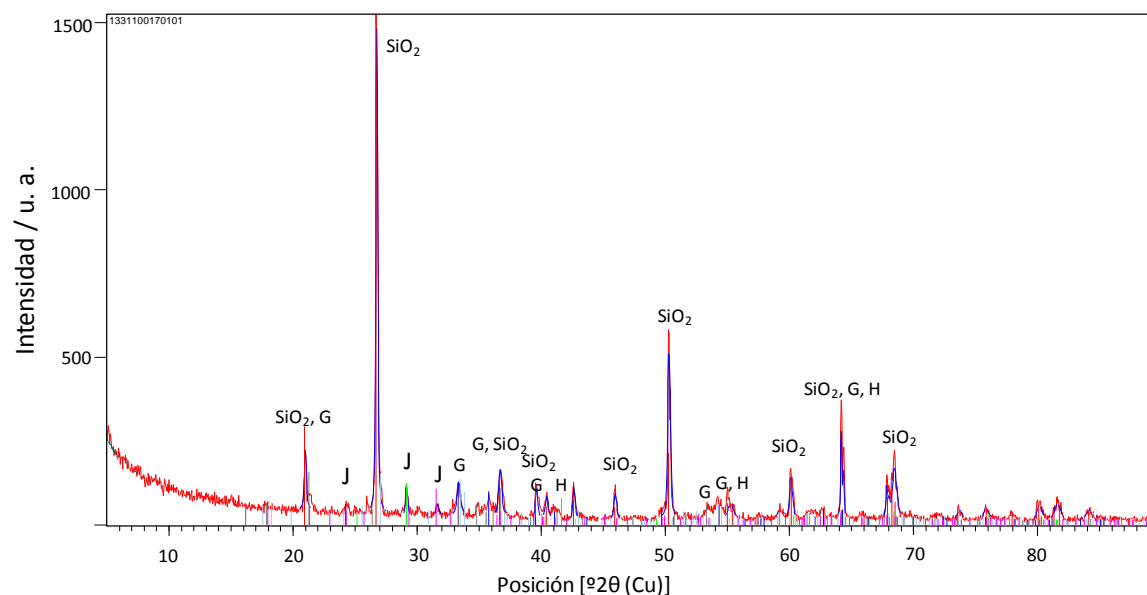


Figura 54. Difractograma de rayos X del mineral de goossan de Río Tinto utilizado en los ensayos de biorreducción. G = goethita; J = jarosita; H = hematita.

Este mineral procedente de Río Tinto se utilizó como fuente de hierro de los tres cultivos de microorganismos reductores de Fe(III) y se agregó al medio en una concentración de 10 g/l.

a) Biolixiviación con el consorcio natural

Al igual que en los anteriores ensayos con jarositas, cuando se transformó el mineral por la acción del consorcio microbiano natural se observó la formación de un precipitado negro producto de la aparición de sulfuros en el medio de cultivo. La concentración final de Fe(II) producido por la acción de los microorganismos fue 19 mM, pero prácticamente todo pasó a formar parte del precipitado, como se pone de manifiesto en la figura 55a. Teniendo en cuenta que los análisis del mineral de goossan indican que el porcentaje en peso de hierro es 28,9%, la cantidad de hierro reducida por el consorcio natural supone un 38% del total suministrado. Este rendimiento es inferior al obtenido en la reducción del Fe(III) contenido en las jarositas sintéticas mediante la acción del consorcio natural, lo que indica que no todo el hierro presente en el goossan está

biodisponible. Cabe destacar, no obstante, que la velocidad de reducción fue bastante alta alcanzándose el máximo de biorreducción en tan sólo 3 días.

Además, el potencial redox experimentó inicialmente un rápido descenso, producto de la reducción metabólica del Fe(III) con la consiguiente formación de Fe(II). Este proceso se vio acompañado de un incremento del valor del pH (Figura 55b). Aunque, como ya se ha mencionado anteriormente, la precipitación de sulfuros de hierro conllevaría la acidificación del medio (reacciones 10 y 15), que sería al mismo tiempo neutralizada con los productos de la oxidación de las fuentes de carbono por las bacterias. Se generan OH^- , que aumentan el pH, y CO_2 que actúa como tampón manteniéndolo en torno a la neutralidad (reacción 11).

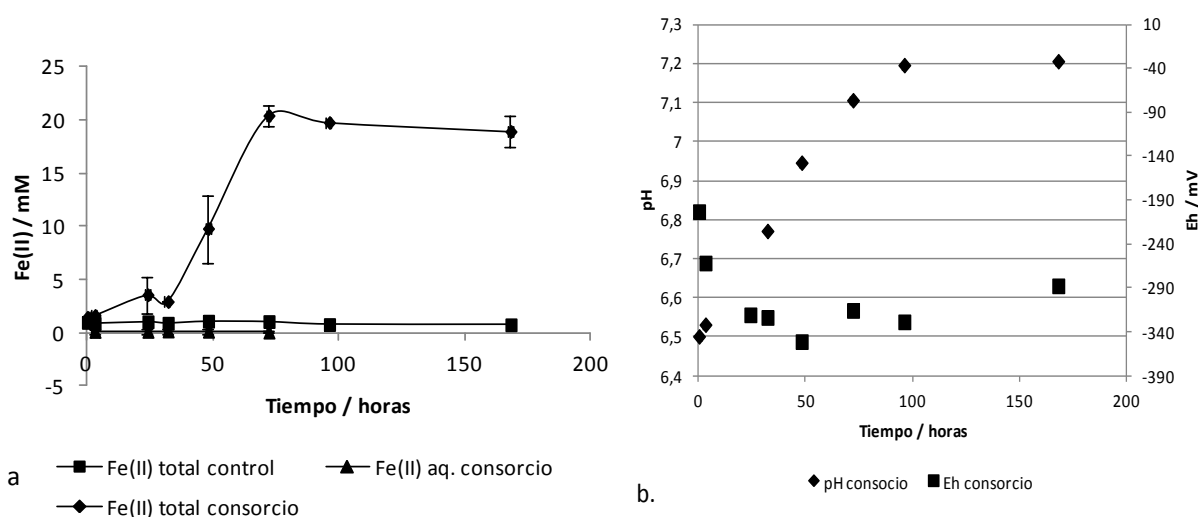


Figura 55. Biolixiviación del mineral de gossan de Río Tinto con el consorcio natural. (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el ensayo.

La figura 56 muestra una imagen de SEM del residuo mineral atacado por el consorcio natural. Se pudo apreciar la transformación por la acción microbiana del mineral y un gran número de microorganismos que se encuentran sobre el sólido desarrollando material extracelular.

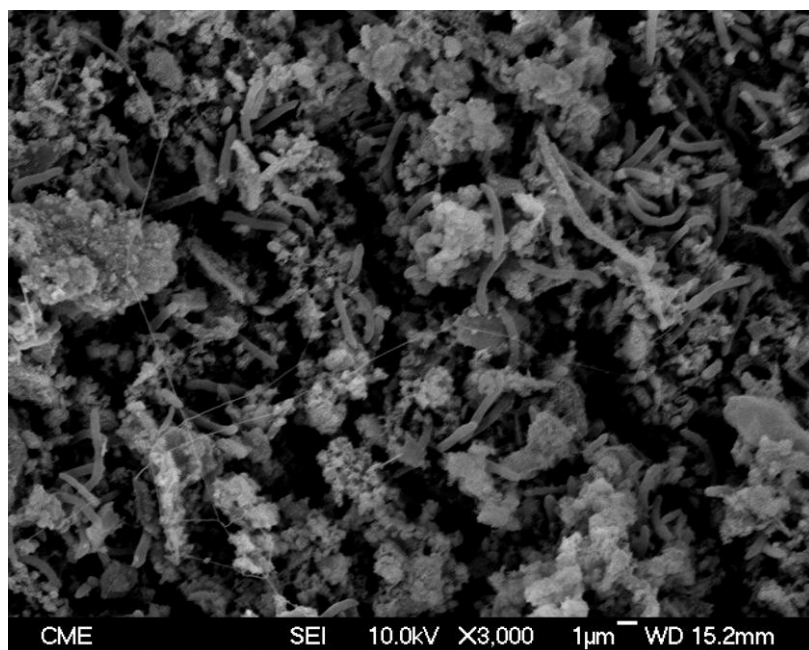


Figura 56. Micrografía SEM del residuo de biolixiviación reductora del mineral de gossan con el consorcio natural.

En la figura 57 se muestra el difractograma de rayos X del residuo generado por lixiviación con el consorcio. Entre los minerales identificados se encuentra el cuarzo, que no es susceptible de ser atacado por los microorganismos. Se detectó, además, goethita, que es una de las fuentes de Fe(III), pero prácticamente no fue atacada. Aunque hay muchos factores, como la cristalinidad, la solubilidad o el área superficial, que pueden influir en la reactividad de los minerales férricos, las bacterias reducen el Fe(III) de los compuestos amorfos preferentemente al de los oxihidróxidos cristalinos y entre las fases cristalinas la reactividad sigue el orden lepidocrocita > hematita > goethita (Munch and Ottow, 1983). Por lo tanto, los resultados observados en el difractograma concuerdan con los estudios de Munch y Ottow ya que la hematita no se encuentra en el residuo sólido tras el ataque microbiano. No obstante, el bajo rendimiento de la reducción de Fe(III) puede sugerir que la goethita podría estar ocluida en otras fases sólidas y no estar disponible para los microorganismos. Los productos principales de la reducción microbiana fueron siderita (FeCO_3), vivianita ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) y argentopirita (AgFe_2S_3), un sulfuro que contiene plata y hierro ferroso y férrico. Como se ha dicho anteriormente, las bacterias sulfato-reductoras del

consorcio natural generan el H_2S , como producto de la reducción del sulfato, que reacciona con los cationes de los metales pesados precipitando sulfuros. Los ambientes mineros contienen con frecuencia metales que pueden ser tóxicos (Johnson, 2012) y, en estas condiciones, su precipitación puede tener efectos beneficiosos para la biorremediación de distintos ambientes contaminados debido a la inmovilización de tales metales (Colleran et al., 1995).

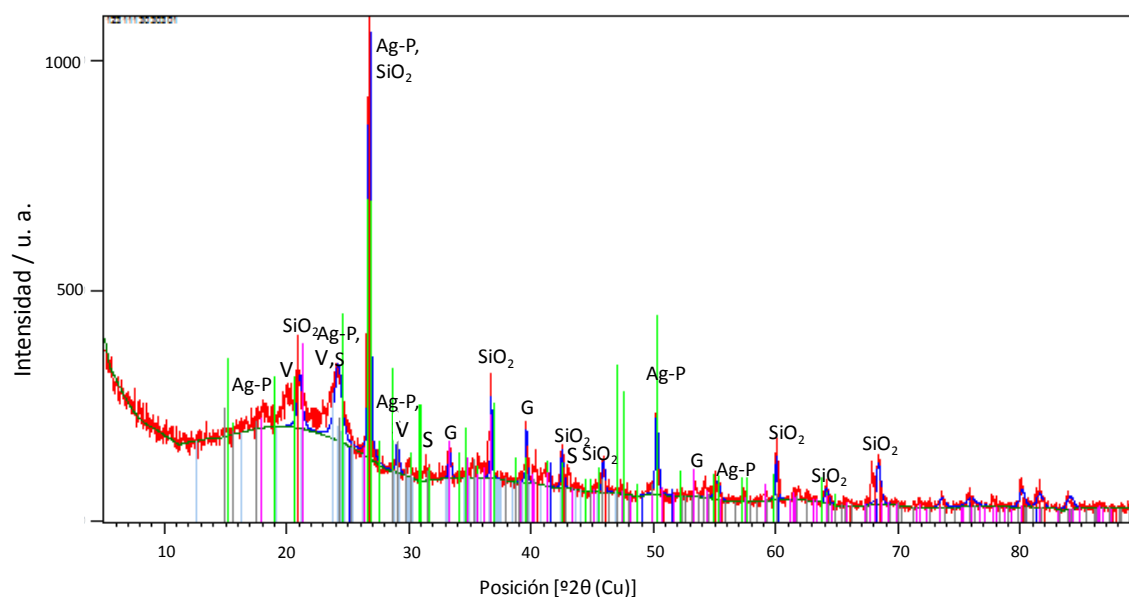


Figura 57. Difractograma de rayos X del residuo del mineral gossan atacado por el consorcio microbiano natural. Ag-P = argentopirita; S = siderita; V = vivianita; G = goethita.

Con el fin de observar la evolución de la población microbiana del consorcio natural tras su adaptación al crecimiento con distintas especies de jarosita como fuente de Fe(III) insoluble (jarositas de amonio y potasio, jarosita de plata y mineral de gossan), se realizó un nuevo análisis molecular (DGGE). El análisis evidenció una sola banda que indica una baja diversidad de géneros. Los resultados de secuenciación reflejan una similitud del 99% con el microorganismo *Desulfosporosinus orientis* DSM 765 en sus genes 16S rRNA. Las especies *Desulfosporosinus* son bacterias sulfato-reductoras que pertenecen a la familia *Firmicutes* y se encuentran en aguas y suelos, así como en medios ricos en sulfatos y contaminados con metales pesados como los drenajes ácidos de mina o de rocas (Sanchez-Andrea et al., 2012). Además de su capacidad para obtener

energía de la reducción de sulfatos, algunas especies de *Desulfosporosinus* pueden crecer utilizando nitrato, Fe(III) o As(V) como aceptores electrónicos, o también mediante procesos fermentativos. *Desulfosporosinus orientis* es una bacteria Gram negativa y es anaerobia estricta. Crece en medios que contienen lactato y sulfato y puede utilizar piruvato, en lugar de lactato, pero no butirato, propionato o acetato (Adams and Postgate, 1959). *Desulfosporosinus orientis* es capaz de reducir Fe(III) (Pester et al., 2012).

El número de especies presentes en el cultivo se redujo notablemente respecto del consorcio obtenido y analizado inicialmente. Esta pérdida de biodiversidad probablemente tuvo su origen en el crecimiento en medios con minerales que contienen altas concentraciones de metales pesados, concretamente la jarosita de plata, que pueden resultar tóxicos para muchos microorganismos. *Desulfosporosinus orientis* ha sido aislado de suelos muy contaminados y posiblemente su capacidad para precipitar sulfuros metálicos propició su supervivencia en estas condiciones.

b) Biolixiviación con *Shewanella putrefaciens*

El mineral de gossan también fue atacado por el cultivo de *S. putrefaciens*. La figura 58 muestra la cinética de biorreducción de Fe(III) presente en el gossan y la evolución del pH y el potencial redox durante el ensayo de biolixiviación. La máxima concentración de Fe(II) en el microcosmos fue 3,4 mM y se alcanzó transcurridos 28 días desde el inicio del ensayo. Además, esta cepa fue capaz de mantener disuelto la mayor parte del Fe(II) generado, alcanzándose una concentración en la disolución de 2,6 mM de Fe²⁺.

Durante el ensayo, el pH aumentó hasta un valor aproximado de 6,5, probablemente debido al efecto tamponante del bicarbonato generado por su metabolismo. El potencial redox disminuyó de forma paralela al aumento de la concentración de Fe(II) generado por la biorreducción del mineral.

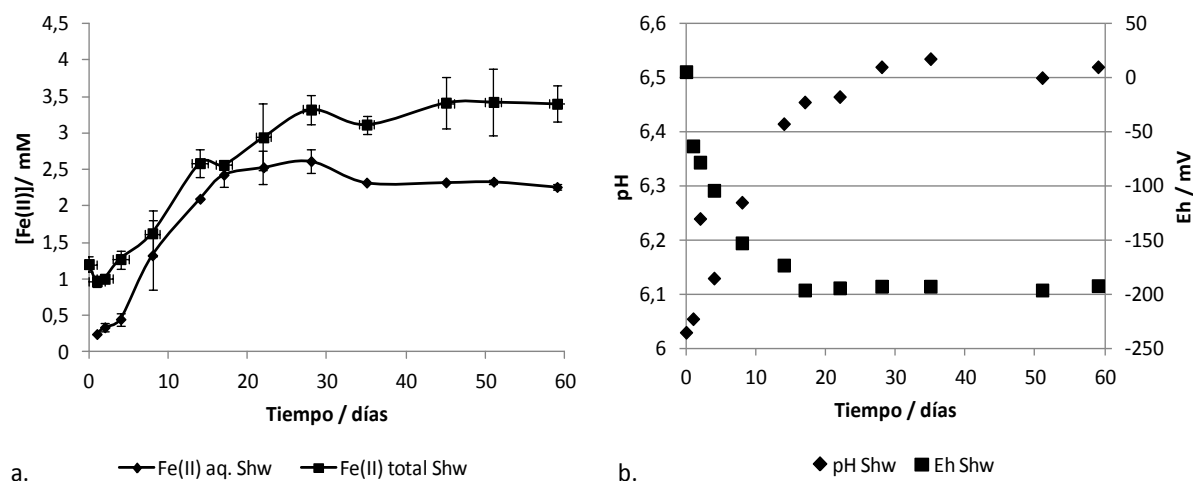


Figura 58. Biolixiviación del mineral de gossan de Río Tinto con *S. putrefaciens*. (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el ensayo.

La figura 59 muestra una micrografía de SEM del cultivo de *S. putrefaciens* crecido utilizando mineral de gossan como única fuente de Fe(III) insoluble. Se observaron las células sobre el sólido; no obstante, al contrario de lo observado con el consorcio natural, los microorganismos, aparentemente, no desarrollaron ninguna biopelícula que les uniese a la superficie del mineral.

La superficie de la bacteria apareció recubierta de partículas sólidas que probablemente se formaron por mineralización inducida depositándose en el exterior del organismo. La biomineralización es el proceso por el que los organismos producen minerales como resultado de su actividad celular, la cual provoca, por un lado, los cambios fisicoquímicos necesarios para que se produzca la nucleación y el posterior crecimiento de los núcleos formados y, por otro, aporta las superficies (pared celular, membranas, compuestos orgánicos, polímeros extracelulares, restos de lisis, entre otros) sobre las que se forman los núcleos, disminuyendo la barrera energética que es necesario superar para que se produzca la nucleación de una fase mineral. Las bacterias llevan a cabo la reducción desasimilatoria de hierro, previa disolución del mineral que contiene Fe(III), produciendo Fe^{2+} que se excreta al medio de cultivo. Los cationes presentes en la disolución se concentran en las zonas cargadas negativamente de la pared celular bacteriana, haciendo que el sistema se sobresature localmente y provocando la precipitación como minerales de los cationes ahí concentrados (Perez-Gonzalez et al.,

2010; Zachara et al., 2002). Para que estos precipitados se formen, se deben dar, al menos, dos condiciones en el medio: valores de pH altos (fruto del metabolismo bacteriano) y alta concentración de cationes en la superficie de las células, las cuales actúan como núcleos de cristalización. La mayoría de los exopolímeros y superficies celulares están cargadas negativamente, lo que provoca la atracción de los cationes por interacciones electrostáticas inespecíficas. Estos biominerales se caracterizan por tener, en general, baja cristalinidad, poca especificidad mineral (suelen ser una mezcla de minerales) y presencia de impurezas. Su morfología, composición y tamaño dependen, entre otros factores, de las condiciones ambientales y de la composición del medio (Roh et al., 2006).

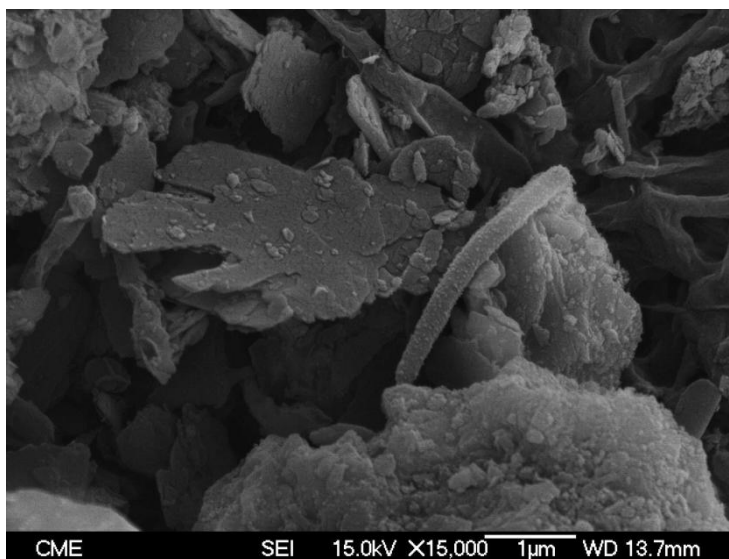


Figura 59. Micrografía SEM del residuo obtenido en el ensayo de biolixiviación reductora de mineral de gossan con el cultivo de *S. putrefaciens*.

El análisis de DRX del residuo de mineral de gossan atacado por el cultivo se muestra en la figura 60. La goethita permaneció sin reaccionar evidenciándose que el mineral férrico atacado fue la hematita. Se identificaron picos correspondientes a la vivianita y la siderita, que son los minerales de Fe(II) que más frecuentemente aparecen en medios anaerobios.

Por otro lado, la disolución del hierro reveló la existencia de minerales con un alto contenido en plata como la argentojarosita. También se identificó el mineral capgaronita

(AgHg(ClBr)S), un sulfuro que contiene plata y mercurio. Ambos metales presentan una elevada toxicidad. Este mineral podría estar presente en el gossan sin atacar. Sin embargo, se observó un ligero oscurecimiento del residuo sólido tras la acción de los microorganismos que podría deberse a la formación de este sulfuro. El hecho de que esta fase mineral no se haya encontrado en los residuos de los otros cultivos podría indicar que su origen fue algún mecanismo de detoxificación de la bacteria *S. putrefaciens* para resistir al mercurio y la plata. Ya se había observado con anterioridad la formación de nanopartículas de plata en la biolixiviación de la argentojarosita con esta cepa. Además, simultáneamente, podrían tener lugar otros procesos abióticos, por la presencia de azufre y otros iones en el medio, que dieran lugar a la precipitación de este sulfuro.

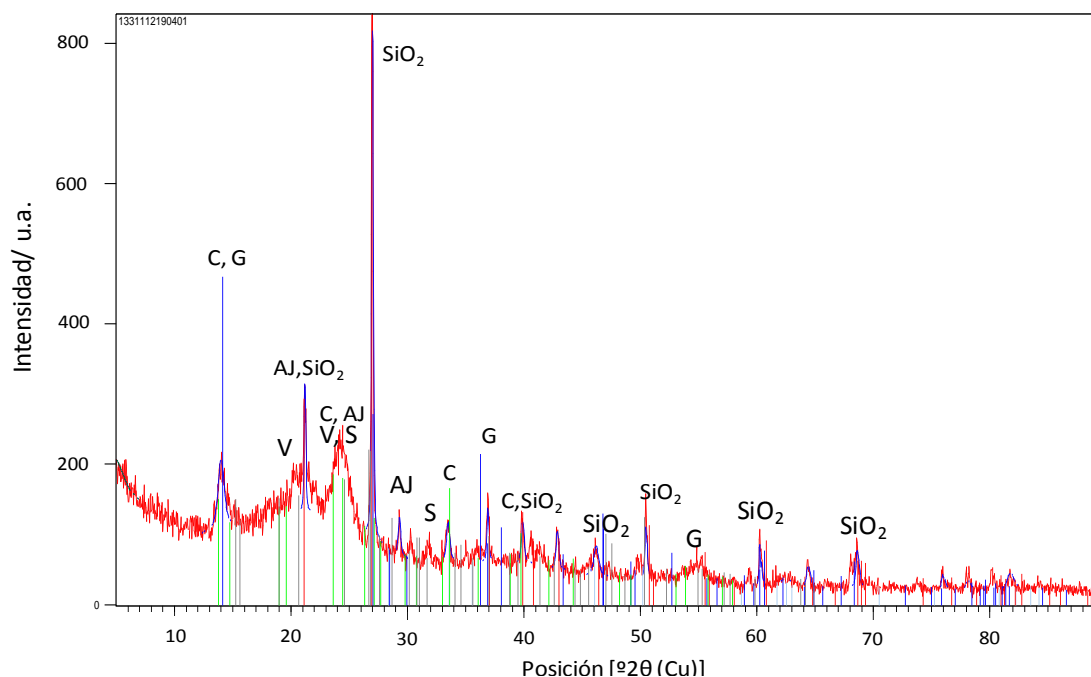


Figura 60. Difractograma de rayos X del residuo del mineral gossan atacado por *S. putrefaciens*. G = goethita; C = capgaronita; AJ = argentojarosita; S = siderita; V = vivianita.

c) Biolixiviación con *Aeromonas hydrophila*

Los resultados de la lixiviación del mineral de gossan se muestran en la figura 61. El aislado *A. hydrophila* mostró capacidad reductora del Fe(III) contenido en mineral

aunque la cinética de reducción fue lenta. Además, se evidenció la capacidad de este cultivo para solubilizar parte del ion ferroso que se produce durante el metabolismo celular (Figura 61a). De forma paralela, se hizo un seguimiento de la evolución del pH y el potencial redox en el microcosmos (Figura 61b).

Con relación a la evolución del pH durante la biolixiviación de la jarosita (Figura 61b), éste aumentó progresivamente hasta pH 6,3 debido al metabolismo celular de *A. hydrophila*, que consume protones en la reducción del Fe(III) que actúa como aceptor de electrones en la cadena respiratoria, y por la formación de bicarbonato como producto de la oxidación de la materia orgánica, que actúa como sustancia tamponante del medio. Asimismo, el potencial redox descendió progresivamente asociado a la formación de Fe^{2+} .

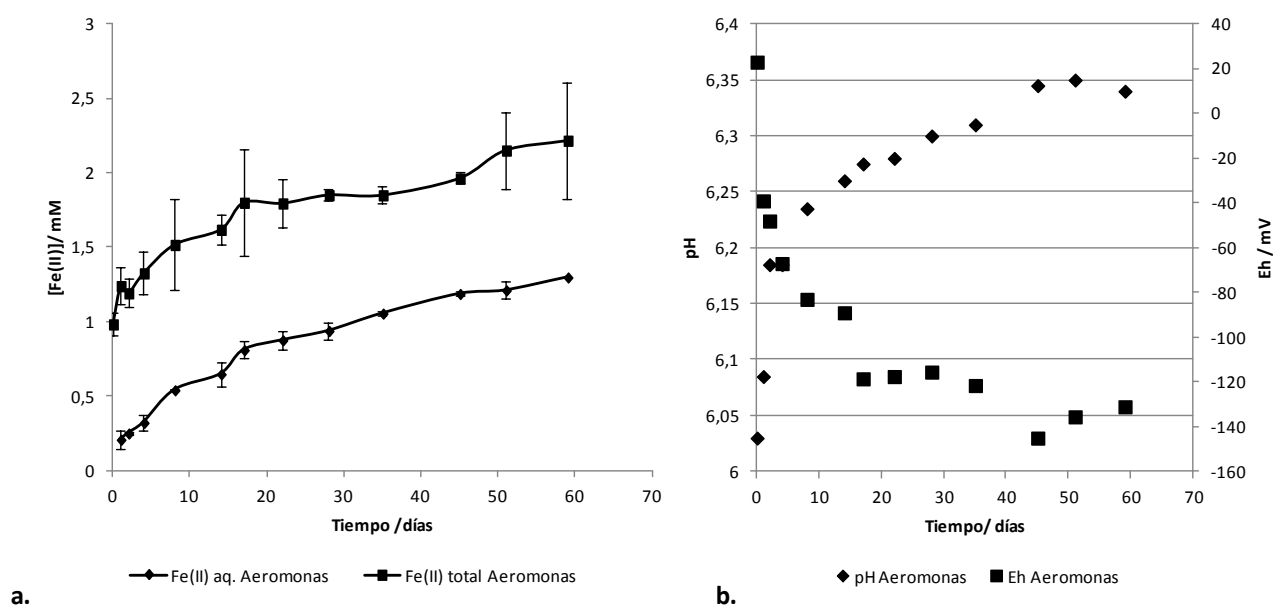


Figura 61. Biolixiviación del mineral de gossan de Río Tinto con *A. hydrophila*. (a) Evolución del porcentaje de hierro reducido y (b) variación del pH y del potencial durante el ensayo.

La figura 62 muestra el mineral de gossan atacado por *A. hydrophila* examinado mediante SEM. Se observaron las células sobre el sólido y se comprobó que se unían mediante hilos de material extracelular con el mineral. El detalle de la imagen 62 pone de relieve la presencia de depósitos en la superficie de algunas bacterias. Un trabajo

reciente ha demostrado que hay células de *Geobacter*, un género de bacterias hierro-reductoras, que acumulan agregados nanométricos de oxihidróxidos de hierro de valencia mixta Fe(II)/Fe(III) en su superficie (Luef et al., 2013). En estas investigaciones se concluye que *Geobacter* utiliza estas partículas de mineral férrico como aceptor de electrones para permitir el crecimiento de las células cuando no están unidas a minerales macroscópicos. Sin embargo, en los experimentos realizados con *A. hydrophila* utilizando jarositas no se observó este comportamiento. Cuando se observaron con TEM los depósitos que se formaron sobre la superficie de *A. hydrophila* y se hizo el análisis EDS (Figura 63), se puso de manifiesto que estaban compuestos por hierro pero también por otros metales como plomo, zinc, arsénico o estaño, todos ellos muy tóxicos para los microorganismos.

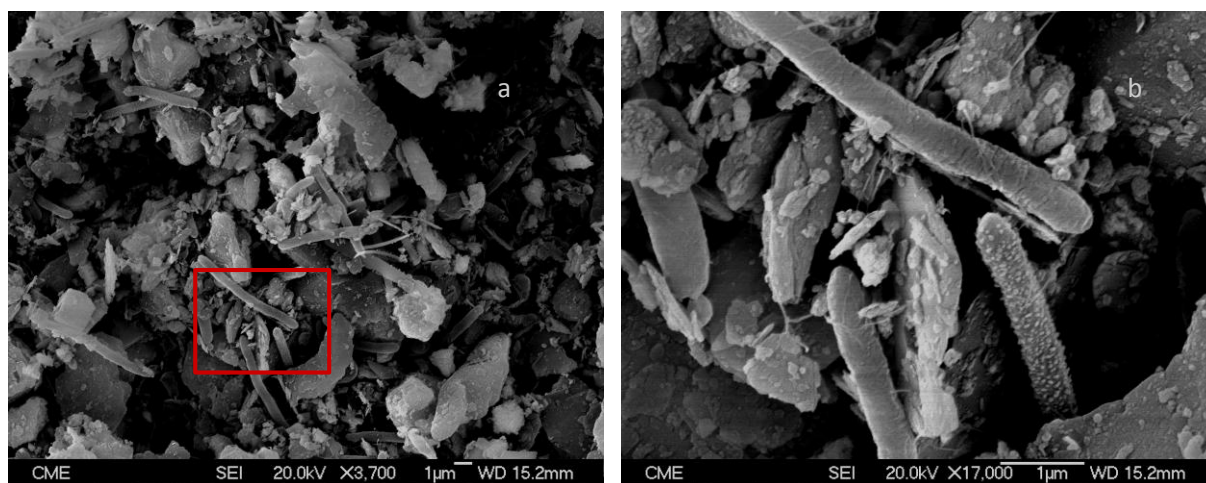


Figura 62. Micrografías SEM del residuo obtenido en el ensayo de biolixiviación del mineral de gossan con *A. hydrophila*.

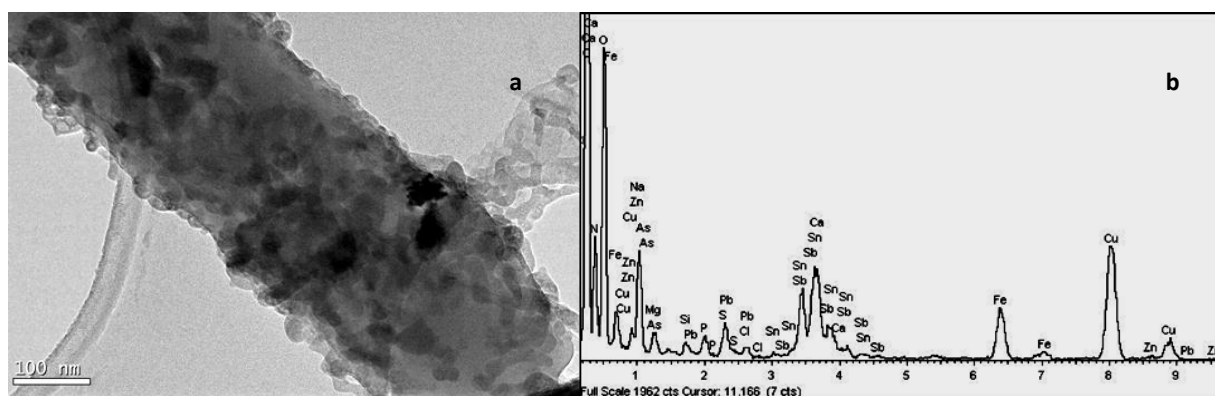


Figura 63. (a) Micrografía TEM de una célula de *A. hydrophila* con depósitos en la superficie. (b) Análisis EDS de una de las nanopartículas de la superficie celular.

El análisis por DRX del residuo de biolixiviación del mineral de gossan con *A. hydrophila* se muestra en la figura 64. Como en los residuos del mineral atacado por los dos cultivos anteriores, se identificó la goethita, por tanto, la fuente de Fe(III) que se redujo fue la hematita, presente inicialmente en el mineral de gossan (ver figura 54). Este resultado coincidiría con otras investigaciones en las que se ha demostrado que las fases amorfas se reducen mejor y, entre las fases cristalinas de minerales férricos, la reactividad de la reducción microbiológica decrece en el siguiente orden: lepidocrocita > hematita > goethita (Munch and Ottow, 1983). Dado que ningún cultivo fue capaz de reducir la goethita, es probable que esta fase mineral esté ocluida en otras y no sea accesible para los microorganismos. Los minerales con contenido en Fe(II) identificados en el residuo tras el ataque microbiano fueron la vivianita y la magnetita.

Además, la disolución de parte del hierro hace que sean detectables otros componentes minoritarios presentes en el gossan que tienen mayor valor económico, como la jarosita de plata, que *A. hydrophila* no es capaz de atacar fácilmente como se puso de manifiesto en el apartado 4.2.2c.

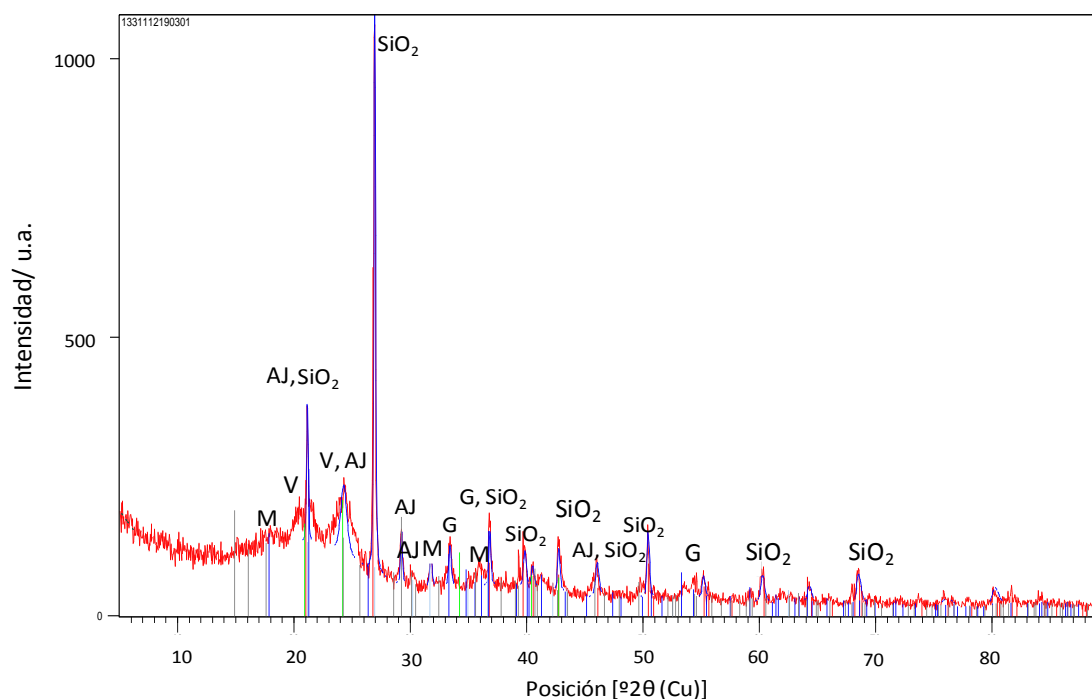


Figura 64. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación del mineral de gossan con *A. hydrophila*. AJ = argentojarosita; G = goethita; M = magnetita; V = vivianita.

d) Comparación de los resultados de biolixiviación reductora del mineral de gossan con los distintos cultivos de bacterias hierro-reductoras

Como se puede deducir de los estudios de biorreducción del mineral de gossan con distintos cultivos microbianos y como se pone de manifiesto en la figura 65, el efecto de la acción microbiana sobre el mineral fue muy diferente.

Cabe destacar, en primer lugar, que la bacteria sulfatorreductora *Desulfosporosinus orientis*, que fue el único microorganismo procedente del consorcio natural que se adaptó al crecimiento utilizando las distintas especies de jarositas como fuente de Fe(III), fue capaz de reducir la mayor cantidad de hierro obteniéndose 1,2 g/l de Fe(II) en sólo 3 días.

Por otro lado, se aprecia que las cantidades de hierro reducido por *S. putrefaciens* y *A. hydrophila* fueron muy inferiores y la reducción tuvo lugar de forma más lenta.

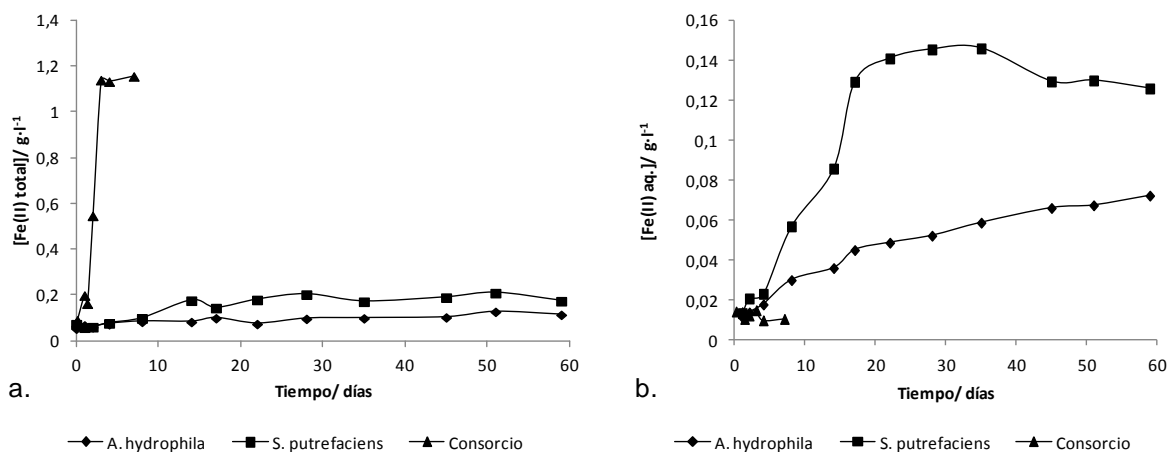


Figura 65. Comparación de la cinética de reducción del Fe(III) (a) y de la disolución del Fe(II) (b) por lixiviación del mineral de gossan con los diferentes cultivos.

Si se compara la cantidad de ion ferroso en solución, los resultados obtenidos son muy diferentes, como se puede ver en la figura 65b. *Desulfosporosinus orientis* formó sulfuros insolubles que contienen Fe(II), de forma que la fase acuosa queda

empobrecida en ion ferroso. Sin embargo, las cepas puras fueron capaces de mantener en disolución la mayor parte del Fe^{2+} generado por biolixiviación del mineral de gossan.

S. putrefaciens disolvió hasta 0,14 g/l de Fe^{2+} , una vez transcurridos 20 días del ensayo, y después se mantuvo constante. Se observó que las células de *S. putrefaciens* aparecen cubiertas de un precipitado mineral cuya formación puede justificarse por la concentración de los cationes presentes en el medio en las zonas cargadas negativamente de la pared celular. La precipitación de las partículas de mineral sobre la superficie de las bacterias provoca el bloqueo de sitios activos en los que se lleva a cabo la reducción de Fe(III) de manera que se inhibe la formación de Fe(II).

La cantidad de Fe^{2+} disuelta por *A. hydrophila* crece de manera continuada pero las concentraciones son inferiores a las obtenidas con *S. putrefaciens*, como se aprecia en la tabla 11. La cinética es lenta probablemente debido a las dificultades que parece encontrar esta especie para establecer el intercambio electrónico con minerales insolubles.

Tabla 11. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de biolixiviación reductora del mineral de gossan. Cantidad inicial de Fe(III) suministrada como mineral de gossan: 10 g/l.

	$[\text{Fe}^{2+}]_{\text{aq.}} / \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	$[\text{Fe(II)}]_{\text{t}} / \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	Composición del residuo
Cultivo natural	0,01	1,2	Sulfuro de Fe(II), argentopirita ($\text{Ag Fe}_2 \text{S}_3$), siderita, vivianita
<i>S. putrefaciens</i>	0,14	0,19	Vivianita, siderita, capgaronita ($\text{AgHg}(\text{ClBr})\text{S}$)
<i>A. hydrophila</i>	0,05	0,09	Magnetita, vivianita

Conclusiones de la Parte 2. Part 2 Conclusions

Los experimentos de biorreducción microbiológica de los diferentes minerales férricos, jarositas y gossan, permiten concluir que:

- 1) Las jarositas pueden ser utilizadas como aceptores de electrones por los microorganismos reductores de hierro y/o sulfato.
- 2) Las cepas bacterianas puras de *S. putrefaciens* y *A. hydrophila* fueron capaces de solubilizar parte del ion ferroso generado en la respiración anaerobia. Por ello, estos microorganismos son de interés para su potencial aplicación en biolixiviación. *S. putrefaciens* fue capaz de mantener en fase acuosa aproximadamente el 60% del hierro suministrado como jarosita de potasio y amonio insolubles. La disolución del hierro favorece la concentración de minerales con mayor valor económico.
- 3) La cinética de biolixiviación de jarositas con *A. hydrophila* es lenta y tiene un rendimiento bajo. La reducción de jarosita en semicontinuo favorece la solubilización de Fe(II) generado en presencia de *A. hydrophila* sugiriendo que de esta forma se evita la precipitación de minerales de Fe(II) sobre los minerales férricos o sobre las células que disminuirían la actividad reductora.
- 4) La composición de las jarositas fue determinante en el proceso de biorreducción. El contenido de metales como la plata inhibió el proceso de biorreducción de los minerales en los cultivos de *A. hydrophila* y *S. putrefaciens*. Sin embargo, se concentraron los minerales que contenían metales valiosos, especialmente en el caso de *S. putrefaciens*. La cepa de *S. putrefaciens* crecida con argentojarosita fue capaz de biosintetizar nanopartículas de plata que podrían ser de interés en diversas aplicaciones tecnológicas.
- 5) *A. hydrophila* y *S. putrefaciens* fueron capaces de reducir y disolver parte del Fe(III) presente en el mineral de gossan pero con un bajo rendimiento y una cinética lenta.

- 6) El consorcio microbiano es capaz de reducir con éxito el hierro disponible en los minerales férricos sintéticos y naturales formando un precipitado rico en sulfuros.
- 7) La existencia de bacterias sulfato-reductoras se evidenció por la formación de sulfuros de distinta naturaleza. Estos sulfuros permiten la inmovilización de metales pesados tóxicos. En consecuencia, este cultivo mixto sería de potencial interés en procesos de biorremediación de drenajes ácidos de mina en ambientes mineros.
- 8) La adaptación del consorcio natural utilizando jarositas de diferente naturaleza, algunas conteniendo metales pesados que pueden resultar tóxicos para las bacterias, dio lugar a una reducción de la biodiversidad presente en el cultivo original identificándose una sola especie: *Desulfosporosinus orientis*, una bacteria Gram negativa sulfato-reductora y anaerobia estricta con capacidad de reducir Fe(III).
- 9) Los principales minerales cristalinos de Fe(II) biogénicos fueron: vivianita, siderita y sulfuros de Fe(II), en el cultivo del consorcio natural; vivianita y siderita, en el de *S. putrefaciens*; y vivianita y magnetita, en el de *A. hydrophila*. La formación de vivianita se debe a la presencia del fosfato en el medio nutriente. La siderita se formó debido a las altas concentraciones de carbonato generado en la oxidación del lactato. La formación de estos dos minerales de Fe(II) inhibe la formación de la magnetita. Los sulfuros de Fe(II) aparecen en el consorcio por la presencia de bacterias sulfato-reductoras.

From the microbial bioreduction experiments with different ferric minerals, jarosites and gossan mineral, the following conclusions can be drawn:

- 1) Jarosites can be used as an electron acceptor by iron and/or sulphate reducing microorganisms.

- 2) Pure bacterial strains of *S. putrefaciens* and *A. hydrophila* showed the ability to dissolve the ferrous ion generated in their anaerobic metabolism. Thus, these microbes are interesting for their potential application in bioleaching. *S. putrefaciens* was able to keep in the aqueous phase approximately 60% of the iron supplied as potassium and ammonium jarosites. The iron dissolution favored the concentration of minerals with a highest economical value.
- 3) The kinetics of the jarosites bioleaching by *A. hydrophila* is slow and the yield is low. The solubilization of Fe(II) by *A. hydrophila* was enhanced in semi-batch experiments suggesting that this procedure avoids the precipitation of Fe(II)-minerals on the jarosites or on the cells, which inhibit the reducing activity.
- 4) The chemical composition of jarosites was a key factor in the bio-reduction process. The presence of toxic metals such as silver, inhibited the iron reduction process. Nevertheless, the minerals containing valuable metals were upgraded, especially in the case of *S. putrefaciens* cultures. *S. putrefaciens* strain grown with argentojarosite, biosynthesized silver nanoparticles. Nanoparticles could be used in several biotechnological applications.
- 5) *A. hydrophila* and *S. putrefaciens* are able to reduce and dissolve part of the Fe(III) present in the gossan mineral, but with a low yield and a slow kinetics.
- 6) The microbial consortium reduced successfully iron from the ferric minerals tested, synthetic and natural, and a black precipitated rich in metal sulphides was formed.
- 7) The presence of sulphate-reducing bacteria in the consortium would be responsible for the formation of different metal sulphide with the ability to immobilize toxic heavy metals. In consequence, this mixed culture could be used in bioremediation processes both in mine environments and in the attenuation of acid mine drainages.
- 8) The adaptation of the natural consortium to grow using different jarosites, some of them containing heavy with toxic effect on bacteria, can lead to the reduction of the biodiversity in the original culture. After the experiments, a unique specie

was found: *Desulfosporosinus orientis*, a Gram-negative sulphate-reducing bacteria able to reduce Fe(III).

- 9) The main crystalline biogenic Fe(II)-minerals were: vivianite, siderite and Fe(II) sulphides, in the natural consortium culture; vivianite and siderite, in the *S. putrefaciens* culture; and vivianite and magnetite, in *A. hydrophila* culture. The formation of vivianite results from the presence of phosphate in the nutrient media. Whereas siderite is formed by the high concentrations of carbonate generated during lactate oxidation. The generation of these two Fe(II)-minerals inhibits the formation of magnetite. Fe(II)-sulphides are produced by sulphate-reducing bacteria in the consortium.

PARTE 3. Mecanismo de reducción de Fe(III) en minerales férricos: estudios de la interacción bacteria-mineral

Se presenta el estudio del mecanismo de biorreducción de Fe(III) con el fin de obtener información de los diferentes modelos que pueden explicar en la transferencia de electrones entre las células y los minerales férricos. Se investigó el efecto de la molécula AQDS, análoga de las sustancias húmicas, como lanzadera de electrones. Se evaluó el efecto del citrato y del EDTA como agentes complejantes del Fe(III) con el objetivo de conocer su influencia en la velocidad y en el rendimiento del proceso de biorreducción. Finalmente, se analizaron el aspecto y la composición de las biopelículas generadas por los microorganismos y su papel en la interacción célula/mineral. Los nanohilos generados por *A. hydrophila* se caracterizaron por su papel en el proceso de transferencia electrónica y su posible interés en otras aplicaciones biotecnológicas.

Aunque en los primeros trabajos de biorreducción de óxidos de hierro se consideraba que los microorganismos reductores de Fe(III) debían establecer un contacto directo con los óxidos y oxihidróxidos férricos para poder reducirlos, posteriormente se ha puesto de manifiesto la existencia de otros mecanismos microbianos para acceder a los sólidos (Kappler et al., 2004; Luu and Ramsay, 2003; Stintzi et al., 2000). Investigaciones recientes han sugerido la participación de compuestos que actúan como lanzadera de electrones y quelantes del hierro (Gram, 1994; Lovley et al., 1998). Dichos compuestos pueden estar presentes en los medios naturales o pueden ser producidos por los propios microorganismos reductores, y facilitarían el flujo de los electrones sin tener que entrar en contacto directo con los minerales (Bird et al., 2011).

Además, las biopelículas microbianas generadas sobre las superficies sólidas son el entorno más inmediato para las células y contienen moléculas que modifican las características de la interacción célula-mineral y que desempeñan importantes funciones para los microorganismos, entre ellos la actividad redox (Neu and Lawrence, 2010).

4.3.1. Influencia de las sustancias húmicas en la biolixiviación reductora del Fe(III) de jarositas

En la naturaleza, los factores que controlan la velocidad y la extensión de la reducción del ion férrico son más complejos que en cultivos bacterianos puros crecidos en el laboratorio. Las sustancias húmicas pueden constituir un mecanismo importante de interacción con los sólidos férricos y de reducción de Fe(III) en ambientes ricos en materia orgánica.

La presencia de las sustancias húmicas que actúen como intermediarios en el proceso redox podría ayudar a superar las limitaciones de la reducción microbiana impuestas por la baja solubilidad de los minerales férricos.

Una molécula lanzadera de electrones para ser un buen mediador en procesos redox debe tener un potencial lo suficientemente bajo como para reducir Fe(III) y lo bastante alto como para ser reducida de nuevo por el microorganismo tras su oxidación química en la reacción con el Fe(III). Por ello, las sustancias húmicas deben presentar un potencial con un valor comprendido entre el potencial de oxidación de la fuente de carbono y el potencial de reducción del hierro. En los casos estudiados, los electrones proceden de la oxidación del lactato a CO₂ mediante la reacción (13) ($E^{\circ} = -343 \text{ mV}$) y se transfieren a minerales de hierro que pueden tener potenciales entre -300 y +100 mV, dependiendo de su concentración de Fe(II) (Kappler et al., 2004).

Las quinonas parecen ser el grupo responsable de la catálisis de la transferencia de electrones en la respiración microbiana en presencia de sustancias húmicas, ya que se ha encontrado una correlación entre la capacidad de aceptar electrones de estas sustancias húmicas y el número de grupos quinona (Scott et al., 1998). Los microorganismos capaces de reducir las sustancias húmicas son capaces de reducir también la antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS), un compuesto análogo de los ácidos húmicos.

La mayoría de los estudios se han realizado con minerales férricos amorfos o con baja cristalinidad. Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de reducción microbiana del Fe(III) insoluble, se estudió la influencia de las sustancias húmicas en la biorreducción de minerales cristalinos, como las jarositas. La experimentación se llevó a

cabo con las jarositas de amonio y potasio sintéticas, que se biolixiviaron con los tres cultivos estudiados, el consorcio natural, *A. hydrophila* y *S. putrefaciens*. Todos los ensayos se inocularon en medios suplementados con 100 μM de AQDS, ya que en esta concentración la molécula presenta un valor de potencial que se encuentra entre el potencial de oxidación del lactato y el potencial de reducción del hierro presente en las jarositas ($E_{0;\text{AQDS}} = -184 \text{ mV}$; $c_{\text{AQDS}} < 0.250 \mu\text{mol}$).

a) Influencia del AQDS en la biorreducción del Fe(III) con el consorcio natural

Como se puede distinguir en la figura 66, cuando el consorcio microbiano natural se cultivó en presencia de AQDS, el sobrenadante adquirió un color anaranjado que no presentaba el cultivo sin la quinona.



Figura 66. Biorreducción del Fe(III) de jarositas de amonio y potasio, (a) en ausencia de AQDS y (b) con AQDS en el medio de cultivo.

Este cambio de color evidencia la formación de AH_2QDS durante el proceso de biorreducción del Fe(III) del mineral, ya que los microorganismos ceden electrones a la molécula de AQDS (Figura 67). En el control abiótico con AQDS no se observó cambio de color ni se formó Fe^{2+} .

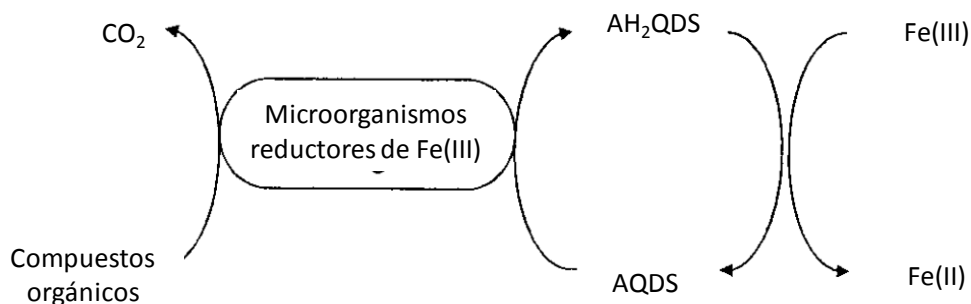


Figura 67. Esquema de la reducción microbiana de minerales de Fe(III) por la acción de las sustancias húmicas como lanzadera de electrones entre los microorganismos y los sólidos férricos.

En la figura 68 se presentan los resultados de la cinética de reducción del Fe(III) de la jarosita con el consorcio natural en presencia de AQDS y se comparan con los correspondientes a la reducción de la jarosita sin la influencia de las sustancias húmicas. Se puede apreciar que el porcentaje de Fe(III) reducido en presencia de la quinona fue similar al observado sin AQDS. No obstante, la adición de la molécula análoga a las sustancias húmicas aceleró el proceso en la etapa inicial, ya que el máximo porcentaje de hierro reducido biológicamente se alcanzó 48 horas antes que en ausencia de AQDS. Por tanto, estos resultados confirman que este consorcio contiene bacterias capaces de utilizar las moléculas del medio como lanzaderas de electrones, sin precisar el contacto directo entre el mineral y la célula, acelerando de este modo el proceso de biorreducción. Sin embargo, la presencia de esta quinona en el medio no tuvo ningún efecto en la solubilidad de los productos de reacción y prácticamente todo el Fe(II) biogénico pasó a formar parte del precipitado de color negro característico de los sulfuros metálicos.

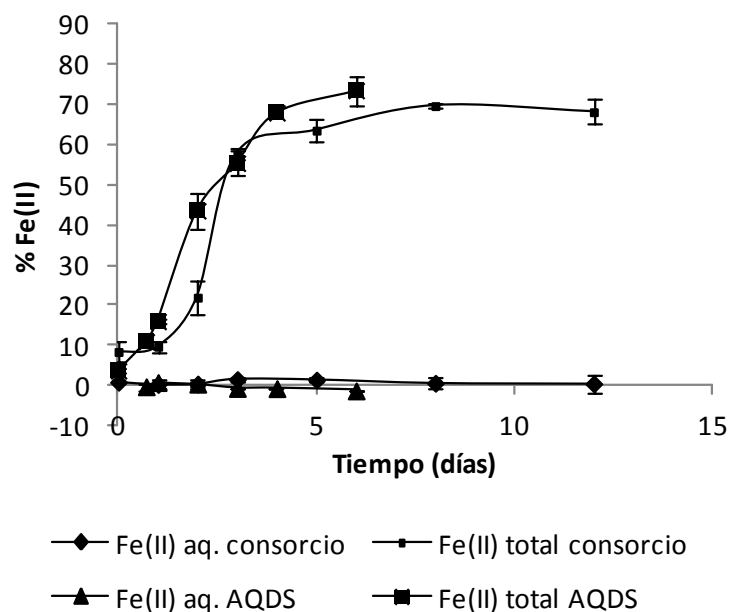


Figura 68. Cinética de reducción del hierro (III) de las jarositas de amonio y potasio con el consorcio en presencia y ausencia de AQDS.

El precipitado originado por el consorcio microbiano en presencia de AQDS se analizó mediante DRX (figura 69) y se identificaron como fases cristalinas predominantes, la magnetita (Fe_3O_4) y la jarosita suministrada inicialmente que no hubo reaccionado. Estos productos fueron diferentes a los obtenidos durante la reducción de jarosita por el consorcio en ausencia de la molécula de AQDS, donde se formaron la siderita y la vivianita (figura 32).

La presencia de sustancias húmicas puede alterar la mineralogía y la cristalinidad de los sólidos ya que estas sustancias tienen una gran afinidad por las superficies minerales (Larese-Casanova et al., 2010). Probablemente, la adsorción de la molécula de AQDS en la superficie del mineral interfiere en el contacto del carbonato con el mineral y favorece la aparición de magnetita.

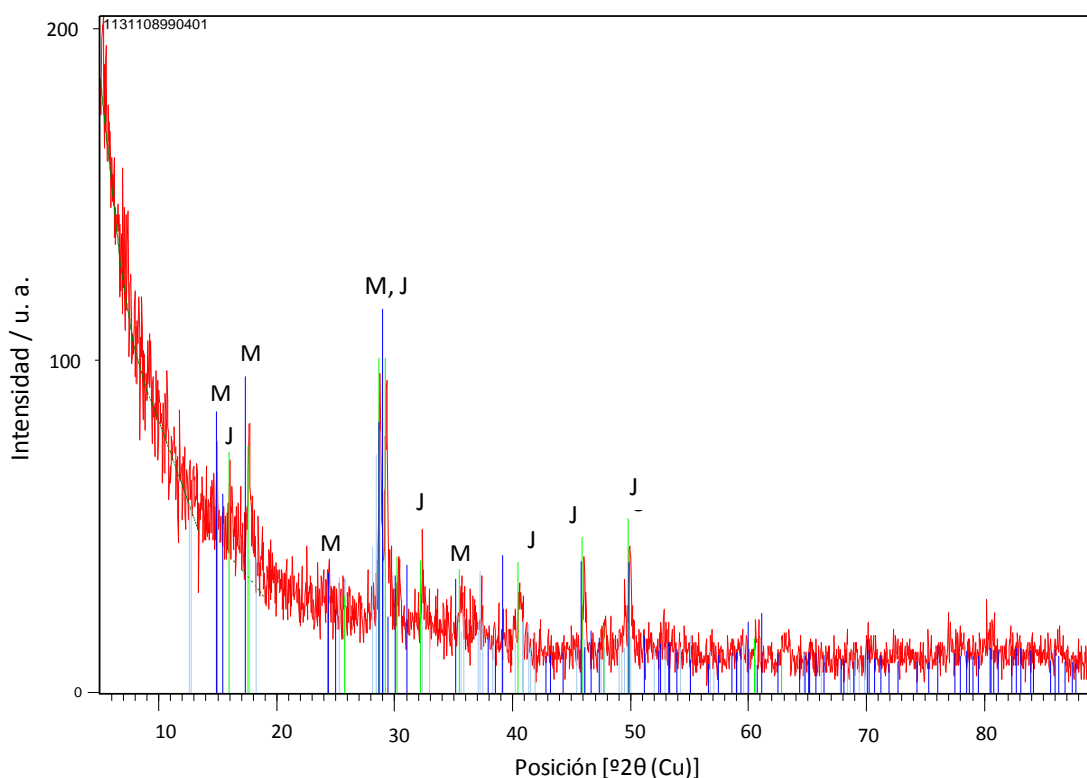


Figura 69. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y potasio con el consorcio natural en presencia de AQDS. M = magnetita; J = jarosita.

La precipitación de magnetita como consecuencia de la reducción microbiológica de las jarositas es una desventaja añadida para la utilización de este cultivo en biolixiviación debido a que contiene una cierta cantidad de Fe(III) que ya no está disponible para la respiración de los microorganismos. El sulfuro de Fe(II) que dio el color negro al precipitado formado en el cultivo no se identificó en el difractograma, posiblemente por presentar un carácter amorfo.

b) Influencia del AQDS en la biorreducción del Fe(III) con *Shewanella putrefaciens*

La adición de AQDS al medio de cultivo de la bacteria *S. putrefaciens* influyó notablemente en la cinética de biorreducción de la jarosita. La primera diferencia que se observó a simple vista fue el cambio de color del medio con quinona, de incoloro a un

tono anaranjado intenso, indicativo de la reducción de la molécula de AQDS (figura 70).



Figura 70. Biorreducción del Fe(III) de jarositas de amonio y potasio con *S. putrefaciens*, (a) en ausencia de AQDS y (b) con AQDS en el medio de cultivo.

En la figura 71 se compara la cinética de reducción del Fe(III) de las jarositas de amonio y de potasio con la cepa *S. putrefaciens* con y sin AQDS en el medio. Cabe destacar que la velocidad de formación de Fe(II) se incrementó notablemente en presencia de la molécula AQDS, alcanzándose el porcentaje máximo de reducción de Fe(III) (87%) en 12 días en lugar de los 30 días que tardó sin el análogo de las sustancias húmicas. Sin embargo, la concentración de Fe^{2+} en disolución fue la misma con y sin adición de AQDS, por lo que se puede concluir que las sustancias húmicas no influyen en el rendimiento de la lixiviación de los minerales férricos pero sí en la cinética del proceso.

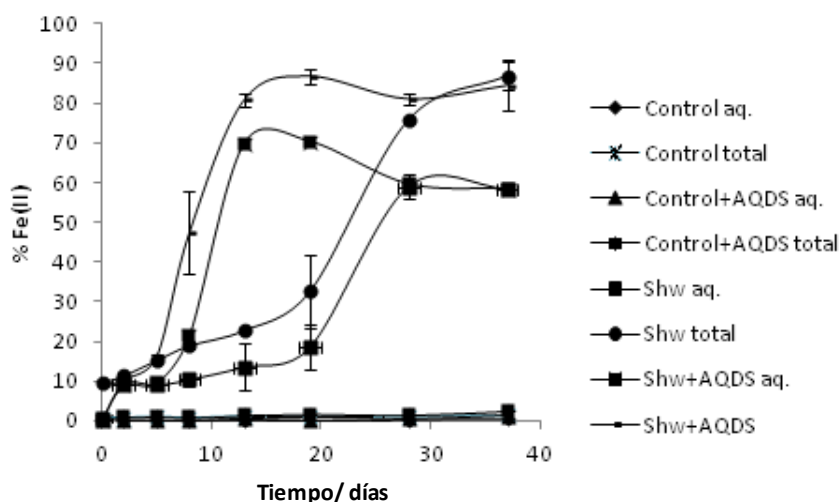


Figura 71. Cinética de reducción del Fe(III) de las jarositas de amonio y potasio con *S. putrefaciens* en presencia y ausencia de AQDS.

Con el fin de identificar los productos de la reducción se realizó el análisis de DRX de los precipitados generados por el ataque de la jarosita con *S. putrefaciens* en presencia de AQDS. Se obtuvo el mismo difractograma que sin AQDS indicando que los componentes principales del sólido fueron la siderita y la magnetita, como se puso de manifiesto en el estudio de biorreducción de jarositas mediante esta cepa pura (figura 35).

Las especies *Shewanella* son capaces de secretar moléculas lanzadera de electrones, concretamente flavinas, que actúan como transportadoras de electrones entre la superficie de la célula y los aceptores de electrones externos (Kim et al., 2002; Marsili et al., 2008). Las bacterias pueden utilizar moléculas presentes de forma natural en el medio que actúan de lanzaderas de electrones entre las células y los minerales férricos, como las sustancias húmicas, en lugar de sintetizar las suyas propias, lo cual constituiría una ventaja energética importante.

c) Influencia del AQDS en la biorreducción de Fe(III) con *Aeromonas hydrophila*

A diferencia de lo observado en los cultivos del consorcio natural y de la cepa de *S. putrefaciens*, el proceso de biorreducción de la jarosita con el cultivo de *A. hydrophila*

no se vio afectado por la presencia de la molécula de AQDS en el medio. El sobrenadante no cambió a color naranja como indicativo visual de la reducción de la quinona sintética.

La figura 72 muestra la comparación de la biorreducción de jarosita por la acción de *A. hydrophila* con y sin AQDS. El porcentaje de Fe(II) biogénico obtenido con y sin molécula análoga a las sustancias húmicas fue en ambos casos del 13% en 47 días de ensayo. La cantidad de Fe^{2+} en la fase acuosa también fue la misma con y sin AQDS. Además, la velocidad de reducción de hierro no aumentó con la adición de AQDS, ni se obtuvieron productos de reacción diferentes en el residuo del ataque del mineral a los obtenidos en el experimento sin AQDS.

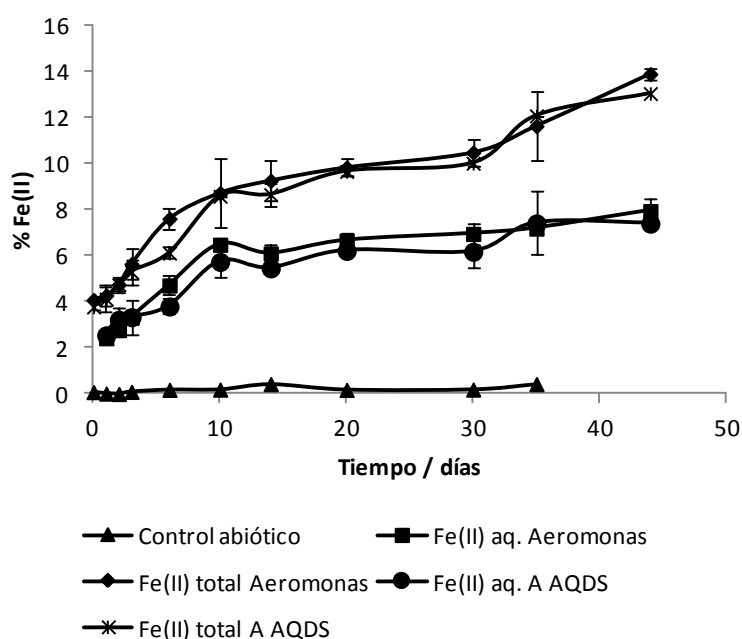


Figura 72. Cinética de reducción del Fe(III) de las jarositas de amonio y potasio con *A. hydrophila* en presencia y ausencia de AQDS.

De estos resultados, se pudo concluir que no todas las especies bacterianas son capaces de utilizar moléculas que actúan como lanzadera de electrones para facilitar el transporte electrónico entre las células y los sólidos. Los datos obtenidos en este estudio parecen indicar que *A. hydrophila* necesita un contacto directo con el mineral de hierro

para reducirlo, ya sea hierro solubilizado o a través de las EPS que permiten la transferencia de electrones.

d) Comparación de los resultados de biorreducción de Fe(III) en presencia de AQDS con los distintos cultivos

Los resultados anteriormente expuestos indican que la transferencia de electrones mediante las sustancias húmicas es un mecanismo importante de reducción microbiana de Fe(III), incluso en minerales cristalinos como son las jarositas. La presencia de estas sustancias procedentes de la degradación de materia orgánica tiene, en consecuencia, un papel importante en el ciclo del hierro en ambientes naturales.

La adición de AQDS a los cultivos del consorcio natural y de *S. putrefaciens* provocó un incremento de la velocidad de la biorreducción del Fe(III) de la jarosita. Incluso en concentraciones tan bajas como 100 μM , la quinona estimuló la biolixiviación reductora de los minerales. Este efecto fue especialmente relevante en el cultivo de *S. putrefaciens*, donde se redujo el 87% del hierro en sólo 12 días, mientras que sin AQDS tardó 32 días.

No obstante, no todas las especies son capaces de utilizar las moléculas presentes en el medio como lanzadera de electrones entre las células y los minerales. La velocidad de reducción del Fe(III) de la jarosita con *A. hydrophila* no experimentó ninguna mejora con la adición de AQDS, indicando que la reducción en este caso es únicamente enzimática y que se precisa del contacto directo entre la célula y el Fe(III).

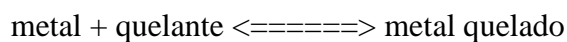
4.3.2. Influencia de los agentes quelantes en la biorreducción de jarosita

El papel de los agentes quelantes durante la reducción microbiológica de los sólidos férricos ha sido objeto de numerosos estudios (Nevin and Lovley, 2002; Roden and Urrutia, 2002; Urrutia et al., 1999; Vaxevanidou et al., 2008).

Algunos científicos sugieren que el ion ferroso que se genera durante la biorreducción inhibe la actividad reductora de los microorganismos por su adsorción sobre la superficie de los minerales férricos y por la bioadsorción del ion en la superficie de las bacterias (Roden and Urrutia, 2002; Urrutia et al., 1999). En estas circunstancias, el efecto inhibitorio del Fe(II) disminuiría en presencia de agentes quelantes que al formar complejos con dicho ion evitarían su adsorción y dejarían “libre” tanto la superficie celular como la superficie de la fuente de Fe(III) insoluble.

Sin embargo, otros investigadores consideran que los quelantes de Fe(III) facilitan la reducción microbiológica de los minerales férricos, ya que al disolverse una cierta cantidad de este otro ion mediante su quelación, el aceptor final de electrones del proceso metabólico es una forma soluble de hierro que es más biodisponible que el mismo Fe(III) incorporado en la superficie del sólido, es decir, en su estructura cristalina (Nevin and Lovley, 2002).

La estabilidad de los quelatos está indicada por su constante de estabilidad, que se define como la constante de equilibrio de la reacción:



por tanto,

$$K = [\text{metal quelado}] / [\text{metal}]$$

Es decir, cuanto más alto es el valor de K, mayor es la estabilidad del complejo.

La tabla 12 muestra la constante de estabilidad de varios agentes quelantes del hierro (Virgili, 1991). Como puede observarse, los quelatos formados con el ión ferroso tienen menor estabilidad que los formados con el ión férrico.

Tabla 12. Constante de estabilidad de algunos compuestos formados con iones quelantes de hierro.

Quelante	log K	
	Fe ³⁺	Fe ²⁺
EDTA	25.0	14.27
EDDHA	33.9	14.3
HEEDTA	19.6	12.2
Citrato	11.2	4.8
Gluconato	37.2	1.0

Con el fin de profundizar en el estudio del efecto de los quelantes en la biorreducción del Fe(III) de las jarositas de amonio y de potasio, con las cepas puras *S. putrefaciens* y *A. hydrophila*, se evaluó la formación de Fe(II) suplementando el medio de cultivo con una concentración 60 mM de compuestos quelantes. Los ensayos se realizaron con citrato y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) por ser dos de los quelantes de hierro más comunes (Figura 73).

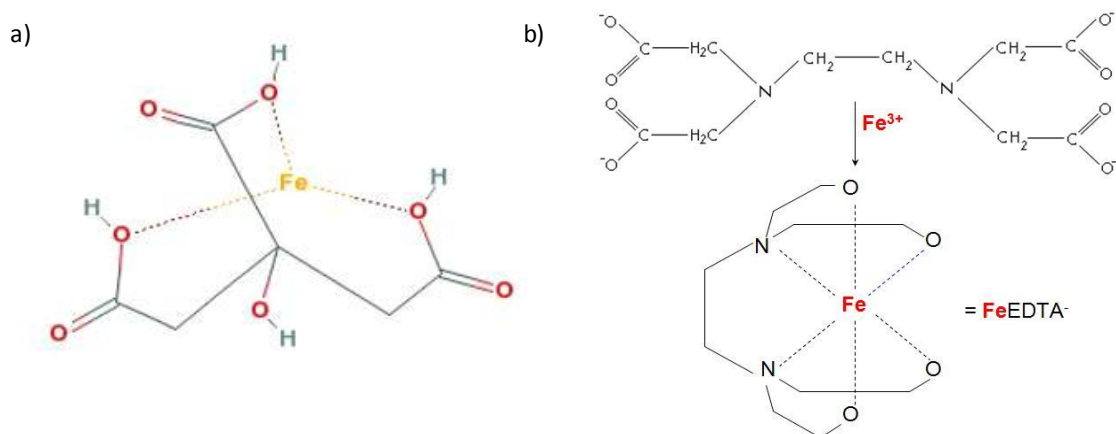


Figura 73. Estructuras de los quelatos de hierro con: (a) citrato y (b) EDTA.

En estos experimentos, la adición de quelantes se combina con el uso de bacterias reductoras de hierro con el objetivo de favorecer la disolución del hierro procedente del mineral. Esta estrategia de solubilización se podría implementar para la recuperación de otros metales presentes en los minerales y que se liberasen simultáneamente al medio acuoso.

Los experimentos de control se llevaron a cabo añadiendo los quelantes al medio junto con la jarosita. Sin embargo, ningún ensayo de control mostró evidencias de reducción de hierro. La disolución de hierro fue inferior al 5% y se debió a la acción química del citrato y del EDTA.

a) Influencia de los compuestos quelantes en la biorreducción de jarosita con *Shewanella putrefaciens*

El cultivo de *S. putrefaciens* exhibió dos comportamientos diferentes cuando se realizaron los experimentos de evaluación del efecto de los agentes quelantes, citrato y EDTA, en la biorreducción de jarosita.

En relación a la influencia del citrato de sodio, los resultados de la cinética de reducción de jarositas de amonio y potasio, por la acción de *S. putrefaciens*, en presencia y ausencia de este quelante, se recogen en la figura 74. Cabe destacar que en el cultivo crecido en presencia de citrato, la velocidad de formación de Fe(II) aumentó notablemente y se alcanzó un porcentaje de reducción del metal superior al 90%, en 100 h, mientras que en el mismo periodo de tiempo, sin quelante, se redujo solo el 20%.

Este comportamiento indicaría que el quelante y las pequeñas cantidades de hierro que solubiliza facilitan la reducción microbiana evitando, o al menos aliviando, la necesidad de desarrollar otros mecanismos para establecer el contacto y la transferencia de electrones con el Fe(III).

Sin embargo, sólo el 67% del Fe suministrado se mantuvo en disolución. Como ya se ha mencionado, la biorreducción de jarositas por *S. putrefaciens* tendría lugar según la siguiente reacción:

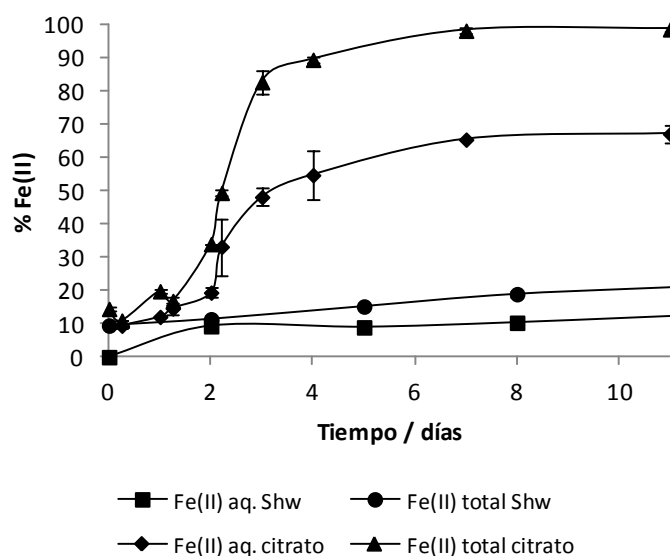
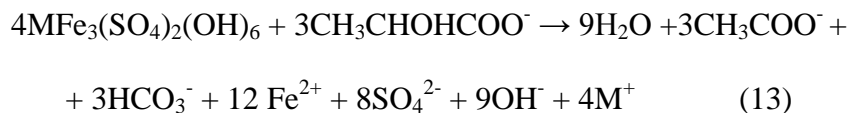


Figura 74. Efecto del citrato de sodio (60 mM) en la reducción del Fe(III) suministrado como jarosita de amonio y potasio (60 mM de Fe) y en la disolución del Fe(II) con el cultivo de *S. putrefaciens*.

Probablemente, los productos generados en el metabolismo celular formaron compuestos insolubles con el Fe(II). Para comprobar este hecho, se analizó por DRX el precipitado blanco obtenido como residuo del proceso de biolixiviación. Los resultados se muestran en la figura 75 a partir de la cual se identificaron sulfatos de amonio y de hierro como componentes principales del residuo de ataque de la jarosita. También se detectó la presencia de carbonato de Fe(II) (siderita), precipitado por reacción del ión ferroso de la disolución con el CO_2 procedente del metabolismo del lactato de *Shewanella*. Si se compara este difractograma con el obtenido en ausencia de citrato (figura 32), se puede observar que, en este caso, el residuo es mucho menos cristalino ya que el mineral de jarosita de partida se transformó y se solubilizó en un alto porcentaje.

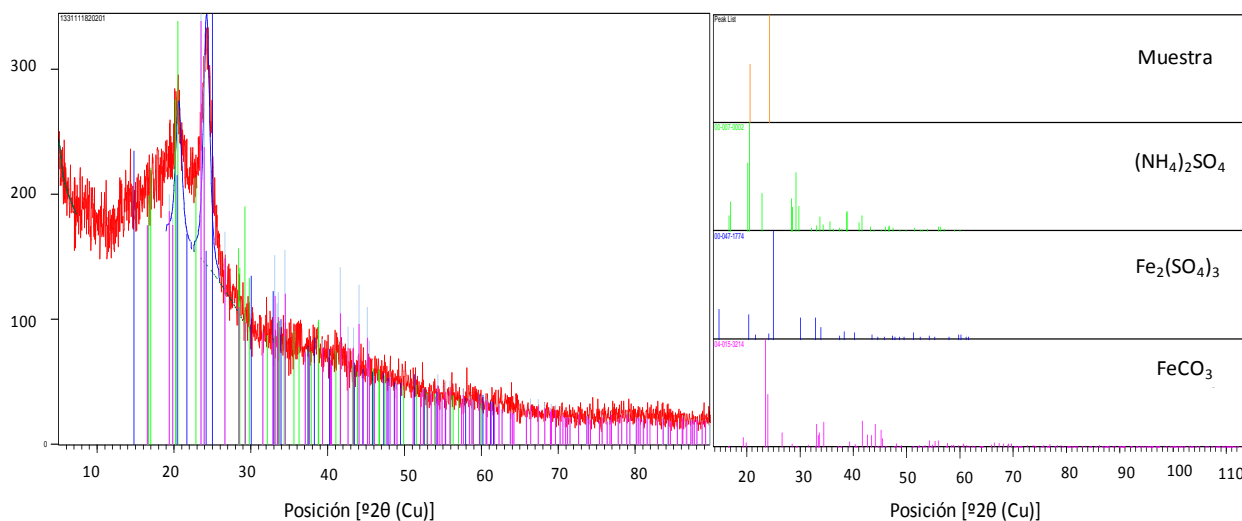


Figura 75. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y de potasio con *S. putrefaciens* en presencia de citrato como agente quelante.

Por otro lado, cuando se ensayó el efecto del EDTA como agente quelante los resultados fueron muy diferentes a los observados en los ensayos suplementados con citrato. La velocidad de solubilización y de reducción de hierro fue muy inferior en presencia de EDTA.

La figura 76 muestra los resultados obtenidos con EDTA y pone de manifiesto que tanto la velocidad de formación de Fe(II) como el rendimiento de la reducción son similares a los observados en ausencia del quelante.

El análisis del residuo mediante DRX, tras los 10 días de reacción en los que se siguió la cinética de reducción, se muestra en la figura 77. Se obtuvo el difractograma de un compuesto cristalino en el que destaca, principalmente, la jarosita suministrada inicialmente como fuente de ion férrico y que aun no se había transformado, confirmando los resultados obtenidos en la cinética de reducción de Fe(III) observados en la figura 76. Algunos picos se identificaron como siderita (FeCO_3) que precipita por reacción del CO_2 , procedente de la oxidación de las fuentes de carbono, con el Fe^{2+} presente en la disolución.

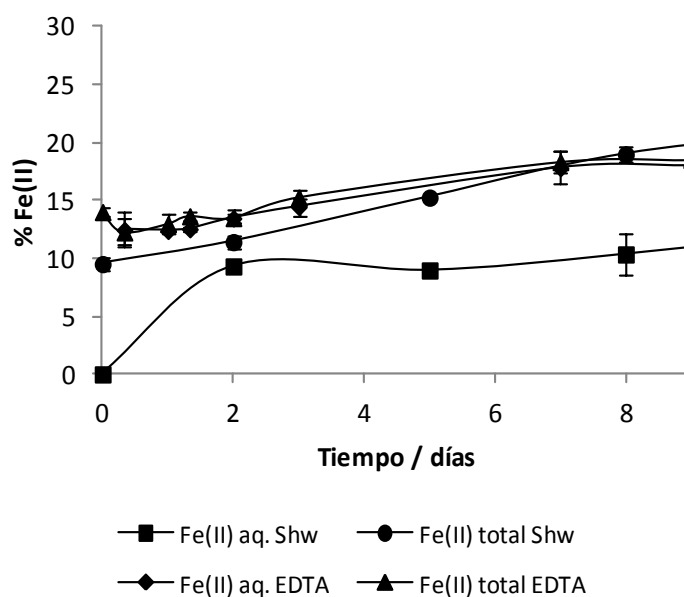


Figura 76. Efecto del EDTA (60 mM) en la reducción del Fe(III) suministrado como jarosita de amonio y potasio (60 mM de Fe) y en la disolución del Fe(II) con el cultivo de *S. putrefaciens*.

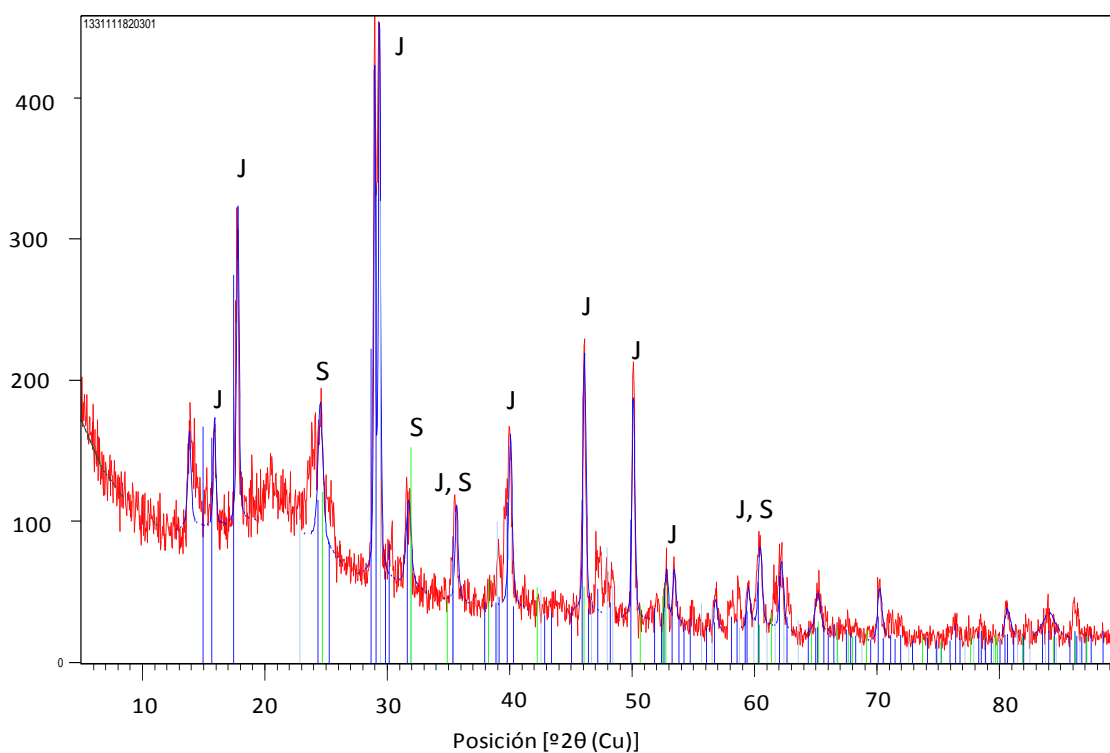


Figura 77. Difractograma de rayos X del residuo de biolixiviación de las jarositas de amonio y de potasio con *S. putrefaciens* en presencia de EDTA como agente quelante. J = jarosita; S = siderita.

Del estudio comparativo del efecto del citrato y del EDTA en la reducción y disolución del Fe(III), se deduce que el citrato de sodio favorece la biorreducción de las jarositas por la acción de *S. putrefaciens*, mientras que el EDTA la dificulta. Este diferente comportamiento puede tener la siguiente explicación. Las enzimas responsables de la reducción de Fe(III) con *S. putrefaciens* tienen su actividad localizada en la membrana celular (Ruebush et al., 2006). Aparentemente, la localización de las Fe(III)-reductasas en la membrana condicionaría el proceso de biorreducción del hierro. En consecuencia, los factores estéricos podrían ser más determinantes que la solubilidad de las especies de Fe(III) cuando se forma un complejo (Dobbin et al., 1995). Los efectos estéricos pueden inhibir la biodisponibilidad del complejo ligando-Fe(III) tanto por oclusión física de la superficie donde se localizan las reductasas como por ocupar los lugares de coordinación de los ligandos (Haas and DiChristina, 2002). Los ligandos elegidos no difieren significativamente en su peso molecular o en su tamaño. Sin embargo, estos agentes quelantes se diferencian en el número de lugares de coordinación al formar los complejos octaédricos de Fe(III). El citrato ocuparía tres de las seis posiciones disponibles en un complejo acuoso 1:1. Esto permite que el complejo disponga de posiciones accesibles para el contacto con la superficie de la célula. Sin embargo, el complejo Fe(III)-EDTA presenta una conformación que bloquea las seis posiciones octaédricas que rodean al Fe(III) convirtiéndolo en un complejo muy estable. Esto hace que la disociación del complejo sea un requisito previo a la reducción enzimática del Fe(III) regido por la constante de estabilidad.

Los resultados del estudio de reducción de las jarositas con *S. putrefaciens* demuestran que la biodisponibilidad de Fe(III) depende de la especiación química del hierro. El citrato sería el ligando orgánico óptimo para mejorar la biolixiviación de minerales férricos utilizando este cultivo. Es un quelante fuerte del hierro pero deja libre algunos lugares de coordinación del Fe(III) que facilitan el contacto celular con el hierro disuelto aumentando notablemente la velocidad de reducción.

b) Influencia de los compuestos quelantes en la biorreducción de jarosita con el aislado *Aeromonas hydrophila*

En primer lugar, se evaluó la influencia del citrato de sodio. La figura 78 refleja los resultados obtenidos de biorreducción y de disolución del Fe(II), con y sin la adición del quelante. Al suplementar el medio con el citrato, se observó una cinética de reducción muy rápida, ya que se redujo el 86% del hierro férrico suministrado en 200 horas; mientras que sin citrato en el medio los microorganismos redujeron solo el 14% tras 44 días de ensayo.

Sin embargo, el aspecto más prometedor desde el punto de vista biotecnológico es que se elimina el problema de la precipitación no deseada de compuestos de hierro que generan muchos cultivos de bacterias hierro-reductoras, puesto que el 77% del Fe(III) reducido a partir de la jarosita insoluble permaneció en la fase acuosa como Fe^{2+} .

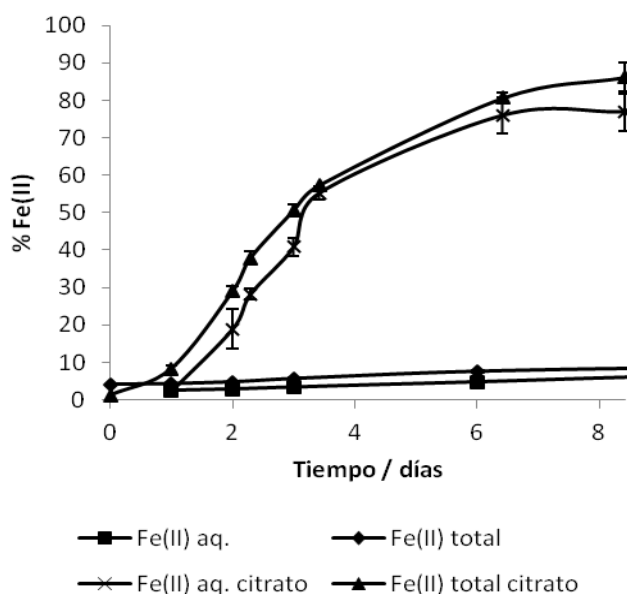


Figura 78. Efecto del citrato de sodio (60 mM) en la reducción del Fe(III) suministrado como jarosita de amonio y potasio (60 mM de Fe) y en la disolución del Fe(II) con el cultivo de *A. hydrophila*.

El resultado del análisis de DRX del residuo del ataque de la jarosita con *A. hydrophila* se muestra en la figura 79. El difractograma indica que el sólido obtenido posee baja cristalinidad, identificándose solamente los compuestos procedentes de la degradación

de mezcla de jarositas que se añadieron como fuente de hierro, concretamente sulfato de amonio y sulfato de hierro y potasio. El sulfato de hierro y potasio contendría el 14% del Fe(III) que no se redujo en el proceso.

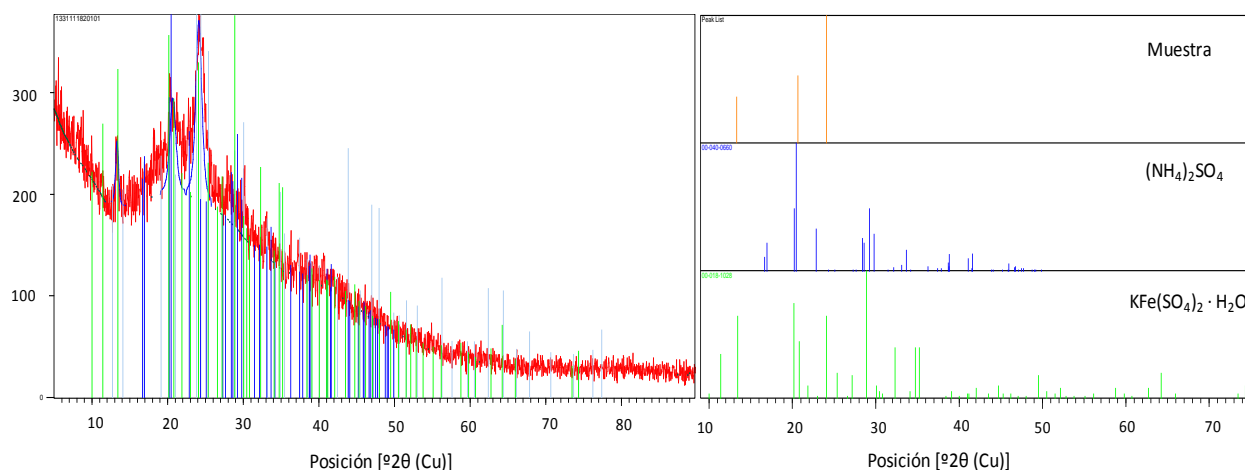


Figura 79. Difractograma de rayos X del residuo de la jarosita atacada por el cultivo de *A. hydrophila* en presencia de citrato como agente quelante.

La figura 80 muestra la evolución con el tiempo de la reducción y de la disolución del Fe(III) de la jarosita por la acción de *A. hydrophila* en presencia de EDTA. Además, en esta figura se comparan estos resultados con los obtenidos sin la adición de EDTA al medio. Se observó un comportamiento similar al de los ensayos realizados con citrato de sodio. El cultivo redujo en una semana, aproximadamente, el 90% del Fe(III) suministrado como jarosita, mientras que en el mismo periodo de tiempo, sin suplementar el medio con EDTA, el cultivo redujo solo el 7% del hierro total, y al cabo de 44 días el porcentaje de Fe(II) fue del 14%. El ion ferroso producido se mantuvo en disolución y al final del ataque no quedó ningún residuo sólido que pudiera ser analizado.

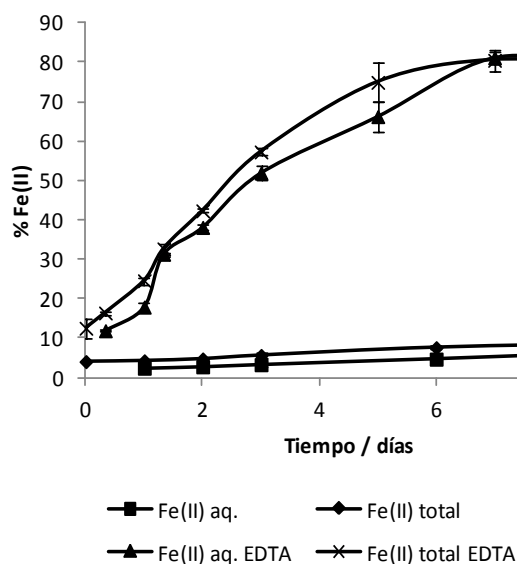


Figura 80. Efecto de la adición de EDTA (60 mM) en la reducción del Fe(III) suministrado como jarosita de amonio y potasio (60 mM de Fe) y en la disolución del Fe(II) con el cultivo de *A. hydrophila*.

La justificación del aumento del rendimiento y de la velocidad de reducción con *A. hydrophila* al añadir los agentes quelantes puede encontrarse en los siguientes hechos. La formación de biopelículas sobre los minerales atacados por *A. hydrophila* que se observaron en el estudio de reducción de jarositas (Apartado 4.2.1c), sugieren la necesidad de la bacteria de establecer un contacto directo con el mineral, a través de material extracelular, que permita la transferencia de electrones entre el hierro insoluble y las células. La conclusión que se puede extraer del notable aumento en la velocidad de reducción al emplear quelantes es que la presencia de hierro en disolución hace que éste sea más biodisponible favoreciendo el proceso de reducción y solubilización de dicho metal.

Además, se ha observado que al cultivar *A. hydrophila* en semicontinuo y retirar el Fe^{2+} presente en la fase acuosa al añadir medio fresco, se favorece la formación de ion ferroso en disolución (Apartado 4.2.1c, figura 39), lo que podría corroborar la adsorción o precipitación de compuestos de Fe(II) sobre minerales férricos o sobre la superficie de las células y su efecto en la disminución de la actividad de las bacterias que llevan a cabo la reducción desasimilatoria de hierro. Los agentes quelantes permitirían solubilizar el Fe(II) e impedirían su precipitación dejando “libres” las superficies para la interacción célula-mineral.

Estos resultados señalan la importancia que tienen los ligandos orgánicos en la movilización de los metales presentes en sedimentos y óxidos de hierro. Los quelantes facilitan el acceso de *A. hydrophila* al Fe(III) insoluble y, debido a que forman complejos de Fe(II) con una constante de estabilidad alta, mantienen en la fase acuosa el producto de la respiración celular.

Desde el punto de vista de la biolixiviación, supone una gran ventaja el mantener altos porcentajes de ion ferroso en disolución puesto que se abren nuevas expectativas de aplicación del proceso de biorreducción anaerobia en el tratamiento biohidrometalúrgico de los minerales de hierro. Además, la disolución del mineral presentaría la posibilidad de recuperar otros metales, con mayor valor económico que el propio hierro, que pudieran estar incorporados a la estructura cristalina de los sólidos férricos.

4.3.3. Biopelículas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

Los microorganismos están presentes en la mayoría de los ambientes naturales y habitualmente aparecen en comunidades, formando biopelículas, que constituyen su entorno más inmediato. Tales microorganismos suponen menos del 10% del peso seco de estas biopelículas, mientras que el 90% restante es la matriz de material extracelular en el que las células están embebidas.

Las EPS desempeñan papeles muy importantes en la biopelícula. Su presencia puede influir en el metabolismo celular y posibilitar varias reacciones con iones metálicos. Por ello, en este trabajo, se trató de caracterizar las EPS de los cultivos reductores de hierro con el fin de determinar el papel que éstas realizan en la adhesión a las superficies sólidas y en la biorreducción del hierro.

Los microorganismos se cultivaron con mineral gossan con el fin de determinar los mecanismos por los que las células interaccionan con los sólidos férricos en el proceso de biorreducción y conocer las moléculas implicadas.

Además, las células también se cultivaron sobre soportes de carbono utilizando como fuente de hierro citrato férrico soluble, ya que la tecnología de inmovilización de células y enzimas tiene aplicaciones en el tratamiento de drenajes ácidos de minas o en la biolixiviación de minerales. Otra aplicación sería en pilas de combustible bacterianas. Algunas especies pueden colonizar el ánodo y transferir electrones directamente a un electrodo mediante las EPS que están en contacto con él (Torres et al., 2010).

Las biopelículas generadas por todos los cultivos se observaron mediante SEM y CLSM. Una de las ventajas de la microscopia confocal es que permite visualizar las biopelículas hidratadas mediante la utilización de tinciones fluorescentes.

Además, en el caso de las cepas puras, las EPS se extrajeron, se purificaron y se caracterizaron mediante medidas colorimétricas convencionales. Este procedimiento no se llevó a cabo en el consorcio microbiano por la diversidad de polímeros generados por los distintos microorganismos presentes.

a) Caracterización de la biopelícula producida por el consorcio natural

La producción de EPS cambia las condiciones fisico-químicas de las interfases y, por lo tanto, influye de forma determinante en los bioprocesos y en la actividad fisiológica de los microorganismos. Algunos estudios recientes han demostrado que las bacterias heterótrofas, incluyendo las bacterias sulfato-reductoras, producen EPS cuya composición afecta a la precipitación y a la naturaleza de los productos.

Como ya se ha indicado, la biopelícula formada por el consorcio natural, sobre distintas superficies, se examinó mediante SEM y CLSM. Las imágenes de SEM revelaron la existencia de material extracelular tanto sobre las fibras de carbono (Figura 81A) como sobre el mineral de gossan (Figura 81B). Destaca la existencia de unos productos filamentosos sobre la superficie. Además, algunas células aparecieron asociadas a una matriz polimérica y al precipitado.

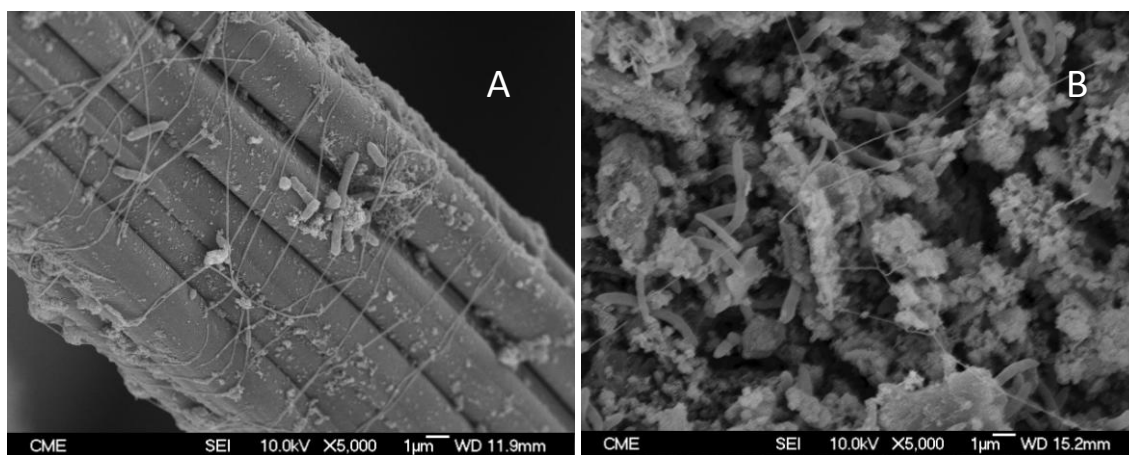


Figura 81. Micrografía de SEM del cultivo del consorcio natural: (A) crecido sobre fibras de carbono y (B) crecido utilizando gossan como fuente de hierro.

En la figura 82 se muestra la imagen de una reconstrucción tridimensional de la biopelícula. La lectina utilizada para la visualización de esta imagen fue PWM, específica para el aminoazúcar *N*-acetilglucosamina. Se pone de manifiesto que las

células se asocian entre sí formando biopelículas de hasta 4,5 μm de espesor en las que los microorganismos aparecen embebidos en una matriz polimérica.

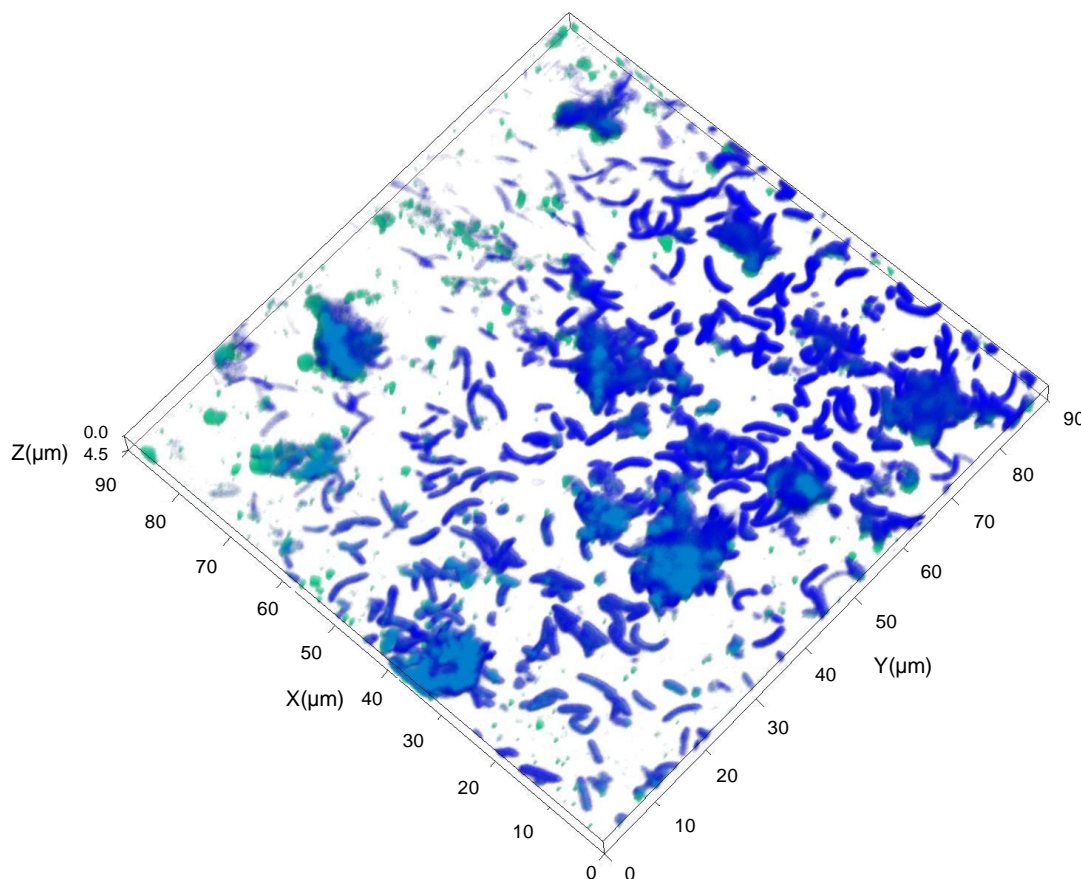


Figura 82. Reconstrucción 3D obtenida mediante CLSM de la biopelícula formada por el consorcio bacteriano sobre mineral de gossan. Las células aparecen en color azul oscuro. La lectina empleada fue PWM.

El análisis químico de las EPS es relativamente sencillo si se trata de un compuesto purificado y aislado, por ejemplo, de un cultivo puro. Sin embargo, en consorcios naturales es muy difícil la determinación de la composición química de las EPS por la gran variedad de potenciales polímeros que pueden producirse.

El análisis de la composición química de los polisacáridos de la biopelícula producida por el consorcio natural se llevó a cabo utilizando CLSM (Figura 83). El objetivo se centró principalmente en el análisis y caracterización de la estructura de la matriz de EPS en la biopelícula a través de la observación de los glicoconjugados. Además, las

tinciones para ácidos nucleicos permitieron observar los microorganismos embebidos en la matriz polimérica. La figura 83 muestra una distribución uniforme de las células en la superficie del mineral indicando que los microorganismos se adhirieron a la superficie y formaron una biopelícula.

Las lectinas ya se han utilizado con anterioridad en algunos estudios de biopelículas en ambientes naturales (Lawrence et al., 2007). Son un grupo de proteínas capaces de unirse específicamente y de forma reversible a los carbohidratos. En general, las lectinas interaccionan con el carbohidrato a través de varios lugares de unión lo que aumenta su afinidad y especificidad (Zippel and Neu, 2011). Para analizar la composición química de los polisacáridos que constituyen la biopelícula desarrollada sobre el mineral se ensayaron diez lectinas conjugadas con FITC y TRITC (tinciones fluorescentes), como se detalla en el capítulo de “Materiales y Métodos”, apartado 3.10.8.2.

Solamente cuatro de las diez lectinas conjugadas que se probaron en estos experimentos mostraron una señal positiva: *Concanavalin A* (Con A), hemaglutinina *Lens culinaris* (LcH), aglutinina de germen de trigo (wheat germ agglutinin (WGA)), y la lectina de la hierba carmín (*pokeweed mitogen* (PWM)). En la figura 83 se presentan las imágenes de CLSM de la biopelícula generada por las bacterias del consorcio natural, con las diferentes tinciones específicas para ácidos nucleicos realizadas para observar la distribución de células. Se presentan únicamente los resultados de las lectinas que exhibieron una respuesta positiva. En la figura también se muestra la combinación de las dos tinciones diferentes aplicadas consecutivamente a la misma biopelícula, la de los ácidos nucleicos y la de las lectinas conjugadas, lo que permite identificar si los polisacáridos se localizan sobre los microorganismos. En la primera columna se observan las células gracias a las tinciones de ácidos nucleicos empleadas (DAPI, SYTO 9 o SYTO 62); en la segunda columna, los residuos de azúcares unidos a las lectinas; y la combinación de ambas señales en la última columna. Las áreas negras indican que no se ha unido ninguna tinción.

Las lectinas Con A y LcH tiñeron los flóculos presentes en el cultivo pero no tiñeron las células. Sin embargo, las lectinas WGA y PWM tiñeron tanto las estructuras floculares como las bacterias.

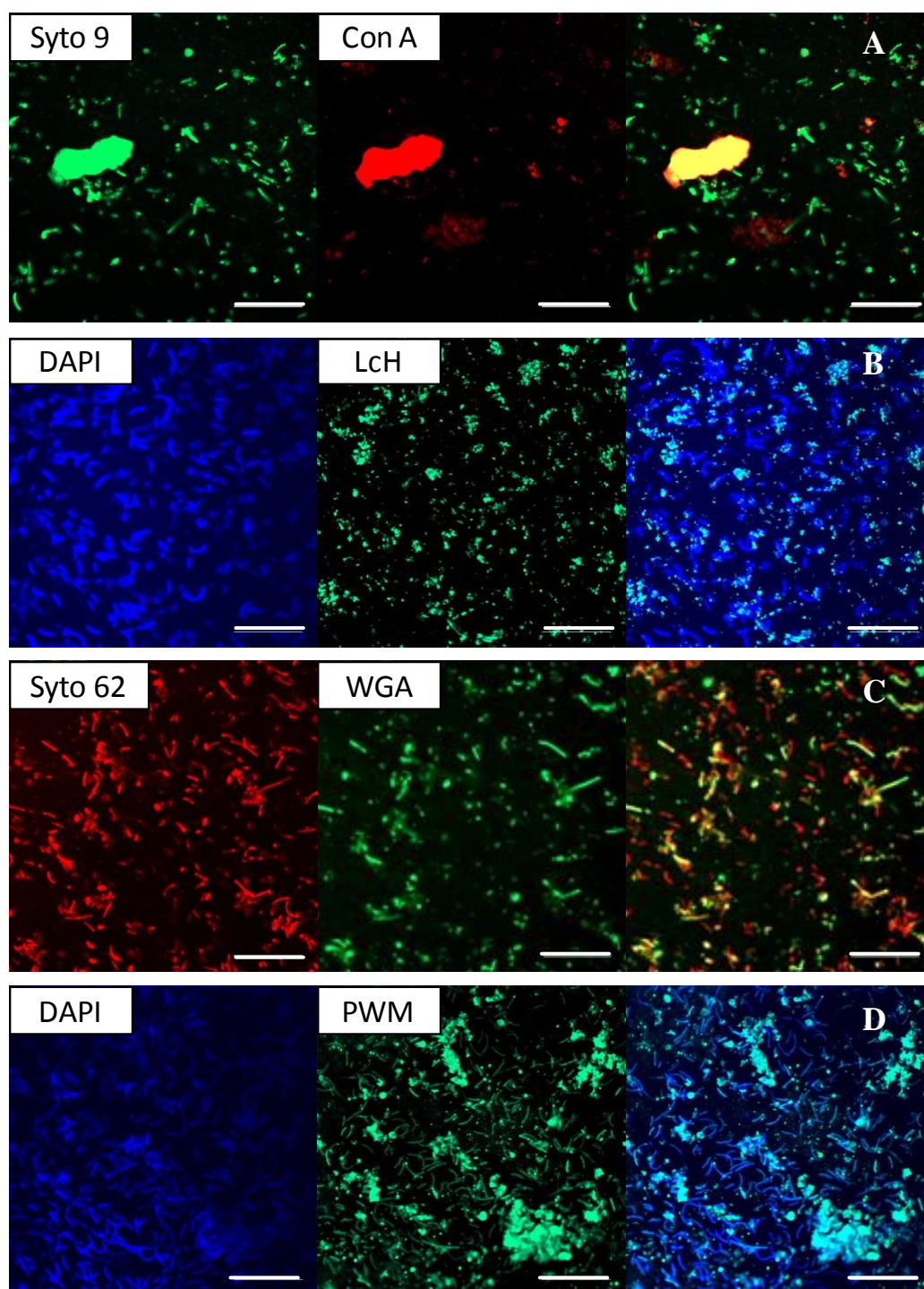


Figura 83. Imágenes CLSM de la biopelícula producida por el consorcio natural con diferentes tinciones específicas para ácidos nucleicos para observar la distribución de sus células. La región fue teñida también con (A) Con A-FITC, (B) LcH-FITC, (C) WGA-FITC y (D) PWM-FITC. La última columna muestra una combinación de las dos señales. Barras de escala: 10 μ m.

La tinción de las biopelículas hidratadas utilizando Con A y LcH fue debida a la unión de estas lectinas a residuos terminales manosil y glucosil presentes en los polisacáridos secretados por los microorganismos que forman el consorcio natural. Se trata de azúcares neutros que se unirían mediante enlaces covalentes a la superficie de las células. La manosa y la glucosa están presentes en muchos polisacáridos secretados por bacterias, como el denominado Psl que desempeña un papel primordial en la adherencia celular a superficies abióticas y bióticas, y ayuda a mantener la estructura de la biopelícula. Durante la unión de las células a la superficie, el Psl se ancla al sustrato y posibilita las interacciones entre microorganismos. Otro polisacárido llamado Pel es rico en glucosa y es esencial en la formación de biopelículas (Flemming and Wingender, 2010).

La visualización de las lectinas WGA y PWM sobre los microorganismos indicó su unión a *N*-acetilglucosamina presente en la superficie celular. También se ha descrito la existencia de exopolisacáridos policatiónicos compuestos por β -1,6-*N*-acetilglucosamina en biopelículas de varias *Proteobacterias* Gram negativas (Izano et al., 2008). Estos polímeros llevan a cabo funciones de adhesión a las superficies de los minerales y de adhesión intercelular, intervienen en la formación de las biopelículas y permiten a los microorganismos resistir ante sustancias nocivas que pudieran existir en el ambiente.

Para muchas bacterias, los exopolisacáridos son indispensables para la formación de biopelículas y las células mutantes que no son capaces de sintetizar polisacáridos extracelulares tienen dificultades o no pueden formar biopelículas maduras. Sin embargo, en cultivos mixtos, las especies microbianas que pueden producir estos polímeros facilitarían la integración de otras especies que no producen una matriz de EPS (Flemming and Wingender, 2010).

Se puede concluir que los exopolisacáridos que forman la biopelícula, además de tener una función estructural, llevan a cabo un papel fundamental tanto en la adhesión a los minerales férricos, que posibilita su transformación, como en la interacción entre los microorganismos que componen el consorcio.

b) Caracterización de las EPS producidas por *Shewanella putrefaciens*

Las EPS capsular y coloidal de las biopelículas producidas por *S. putrefaciens* se extrajeron y se purificaron para su posterior análisis empleando métodos colorimétricos. Se estudiaron las EPS formadas bajo diferentes condiciones de crecimiento. Con este propósito, *S. putrefaciens* se cultivó utilizando citrato férrico soluble como fuente de hierro y se extrajeron las EPS de las células planctónicas (de libre flotación y suspendidas en el medio) y de las células crecidas sobre fibras de carbono. Además, se estudiaron mediante SEM y CLSM las EPS producidas por estos microorganismos crecidos sobre el mineral de gossan suministrado como una fuente de hierro insoluble.

La obtención de las EPS se realizó utilizando EDTA como agente extractante. El rendimiento del tratamiento con EDTA es relativamente bajo comparado con otros métodos químicos de extracción (Zhang et al., 1999). Por ejemplo, la extracción mediante centrifugación con formaldehído tiene un rendimiento del 10%, mientras que la extracción con EDTA alcanza el 2%. Sin embargo, la extracción con EDTA tiene como ventaja que permite detectar el contenido de proteínas y, además, no se produce una lisis celular significativa durante el proceso. Se trata, por tanto, de lograr un compromiso entre el porcentaje de EPS extraídas y su validez para los análisis específicos, lo que convierte a este método en una buena elección para la extracción de EPS de las biopelículas.

En la figura 84 se muestra la cantidad de EPS generada por las células en las distintas condiciones, tanto en la fracción coloidal como en la fracción capsular. Se observó que las células no produjeron mayor cantidad de EPS cuando se suministró un soporte que les permitiera formar una biopelícula. La mayor cantidad de EPS coloidal que se observa cuando la fuente de hierro suministrada es citrato férrico, se debe a que el citrato no se elimina tras la diálisis.

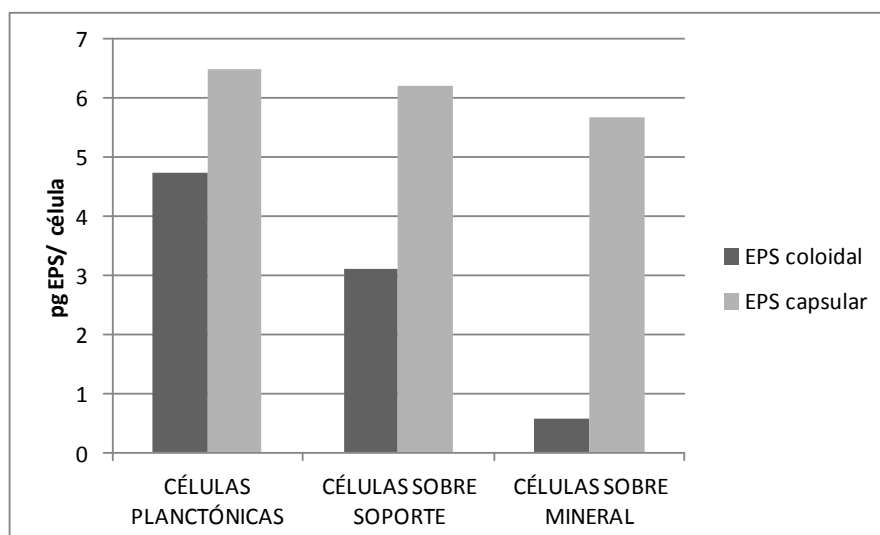


Figura 84. Cantidad de EPS producidas por célula de *S. putrefaciens* bajo diferentes condiciones: células planctónicas; células crecidas sobre soporte de fibras de carbón, empleando una fuente de hierro soluble en ambos casos; y células sobre mineral de gossan (fuente de hierro insoluble).

La composición de las EPS producidas por *S. putrefaciens* bajo diferentes condiciones de crecimiento se analizó cuantitativamente mediante los métodos químicos colorimétricos convencionales detallados en la sección “Materiales y Métodos” apartado 3.7. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Composición química de las EPS producidas por *S. putrefaciens* crecidas bajo diferentes condiciones.

		Composición de EPS total en % (peso/peso)		
		Carbohidratos	Proteínas	Ácidos urónicos
Células planctónicas (Fe soluble)	Coloidal	2,92	1,07	0,62
	Capsular	-	11,62	2,79
Fibras de carbono	Coloidal	2,71	1,99	0,65
	Capsular	-	14,79	3,85
Mineral gossan	Coloidal	-	9,39	1,62
	Capsular	2,82	26,07	3,51

Cabe destacar que las EPS extraídas de los cultivos de *S. putrefaciens* estaban constituidas principalmente por proteínas. La abundancia de proteínas puede deberse a que los aminoácidos y los péptidos actuarían como transportadores de metales a través de la membrana. En la biopelícula de otras especies de *Shewanella* se han detectado varias proteínas redox, entre ellas los citocromos c, MtrC y OmcA, implicados en la transferencia extracelular de electrones (Cao et al., 2011; Reardon et al., 2010).

Sin embargo, la tabla 9 también pone de manifiesto que la cantidad de polisacáridos que forman las EPS es muy baja. Éstos se encontraron en la fracción capsular cuando el cultivo creció utilizando mineral de gossan como fuente de hierro. Probablemente, los polisacáridos están implicados en la formación de la matriz de la biopelícula interviniendo en su estabilidad mecánica y conformando su arquitectura. Además, podrían proteger a las células frente a altas concentraciones locales de iones metálicos, como Fe^{2+} y Mn^{2+} , que de otra forma se acumularían durante la reducción de óxidos de Fe(III) y Mn(IV) y que podrían inhibir su crecimiento (Liu et al., 2001).

Otros componentes de las EPS producidas por *S. putrefaciens* son los ácidos urónicos, que contienen grupos polares. Los ácidos urónicos favorecen la formación de geles, el intercambio iónico y la acumulación de iones de metales tóxicos contribuyendo a la detoxificación medioambiental.

Caracterización de las EPS mediante FTIR

Las EPS extraídas de los cultivos de *S. putrefaciens* se analizaron mediante FTIR. Las bandas de absorción características no se obtuvieron para su análisis cuantitativo, sino para determinar los grupos funcionales presentes y observar la concordancia con los análisis químicos cuantitativos.

La espectroscopia FTIR permite identificar los grupos funcionales más importantes presentes en las EPS extraídas de los cultivos celulares y confirmar los resultados obtenidos durante los análisis colorimétricos.

En la figura 85 se muestran los espectros FTIR correspondientes a los controles abióticos realizados con citrato férrico y con mineral tras dializarlos y liofilizarlos de la misma manera que se hizo con las EPS.

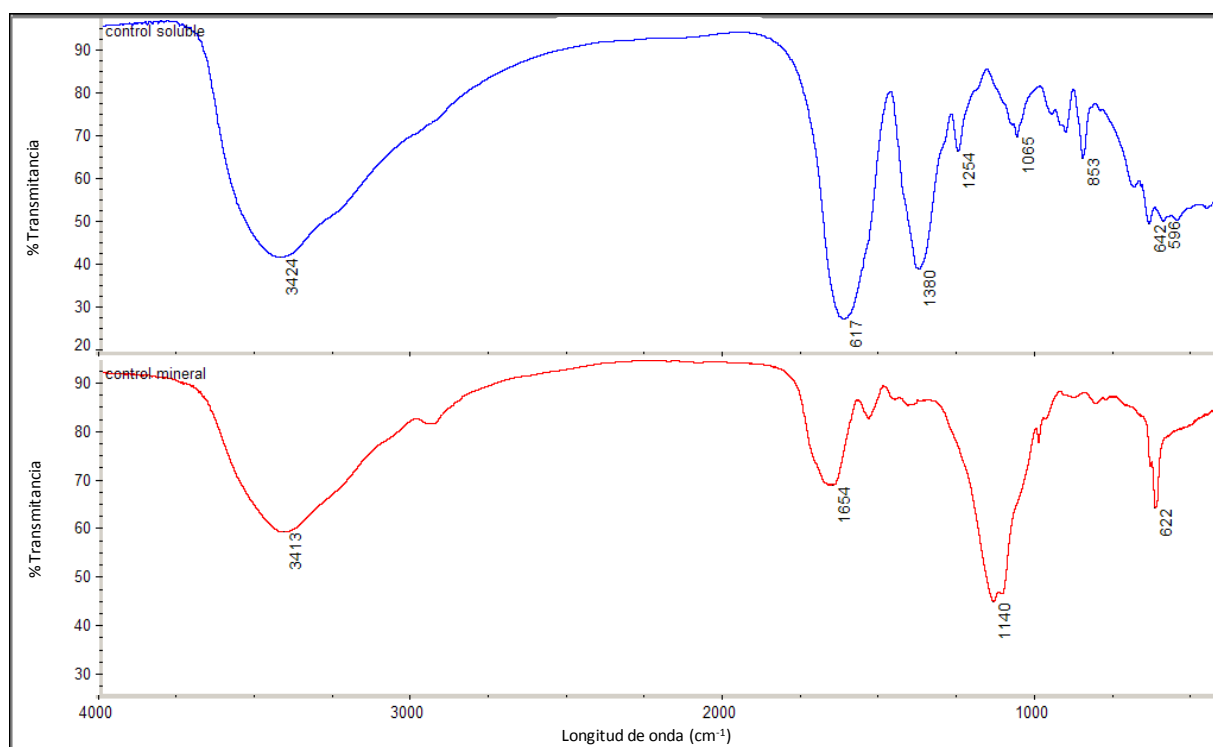


Figura 85. Espectros FTIR de los controles abióticos de los medios ensayados: con citrato férrico (azul) y con mineral (rojo).

El espectro del control abiótico del medio con citrato soluble exhibió dos bandas intensas a 1617 y 1380 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de tensión antisimétrica y a la tensión simétrica de los grupos carboxilato COO^- , respectivamente. Además, apareció una banda ancha e intensa a 3424 cm^{-1} que se atribuye a las vibraciones de tensión del grupo funcional hidroxilo O-H. Se puede concluir que estas son las bandas características del citrato de hierro. Por lo tanto, no se consiguió eliminar el citrato en el proceso de dialización.

En el espectro FTIR del control abiótico con el mineral, se observó con claridad la banda a 1654 cm^{-1} correspondiente a la tensión antisimétrica C=O. Por otro lado,

aparecieron dos bandas intensas: una a 1140 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de tensión del enlace C-O de los alcoholes, y otra más ancha a 3413 cm^{-1} , atribuida a las vibraciones de tensión del grupo funcional hidroxilo O-H. Por tanto, se observaron las bandas que corresponderían al lactato, que fue el componente orgánico predominante en el medio. El lactato posee un solo grupo carboxilato en su molécula mientras que el citrato tiene tres. Por ello, la intensidad de las bandas correspondientes al carboxilato fue menor.

La figura 86 recoge los espectros FTIR de las fracciones de EPS coloidal y capsular de las células planctónicas crecidas en citrato férrico como fuente de hierro soluble (Figura 86A) y los correspondientes a las EPS de las células cultivadas en mineral de gossan como fuente de hierro insoluble (Figura 86B).

Los espectros FTIR de la fracción coloidal de las EPS fueron diferentes en las dos condiciones ensayadas. El espectro de la fracción coloidal de las EPS de las células crecidas en citrato férrico exhibió dos bandas intensas a 1622 y 1386 cm^{-1} . La primera es característica de las vibraciones de tensión antisimétrica y la segunda de la tensión simétrica del grupo carboxilato COO^- . Las dos bandas están asociadas con la presencia de citrato en el medio lo que indica que *S. putrefaciens* utilizó el lactato como fuente de energía y el citrato permaneció en disolución actuando como quelante del hierro.

En el espectro de la fracción coloidal de las EPS producidas por *S. putrefaciens*, cuando las células crecen con mineral de gossan, se observa también una banda ancha e intensa a 2431 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de tensión de los grupos hidroxilo O-H y amino N-H. Además, aparecen dos bandas intensas y anchas, a 1628 cm^{-1} y a 1396 cm^{-1} , probablemente debido a la superposición de bandas correspondientes a distintos modos de vibración de diferentes grupos funcionales. La primera, se asignaría a la amida I y a la vibración de tensión antisimétrica del grupo carboxilato COO^- . La segunda, correspondería a la vibración del grupo C-N. La banda a 1067 cm^{-1} se puede asignar a las vibraciones de tensión del enlace C-O de los alcoholes. Estos resultados coincidieron con los obtenidos en el análisis químico y confirman que el componente principal de las EPS de la fracción capsular son proteínas (Tabla 13).

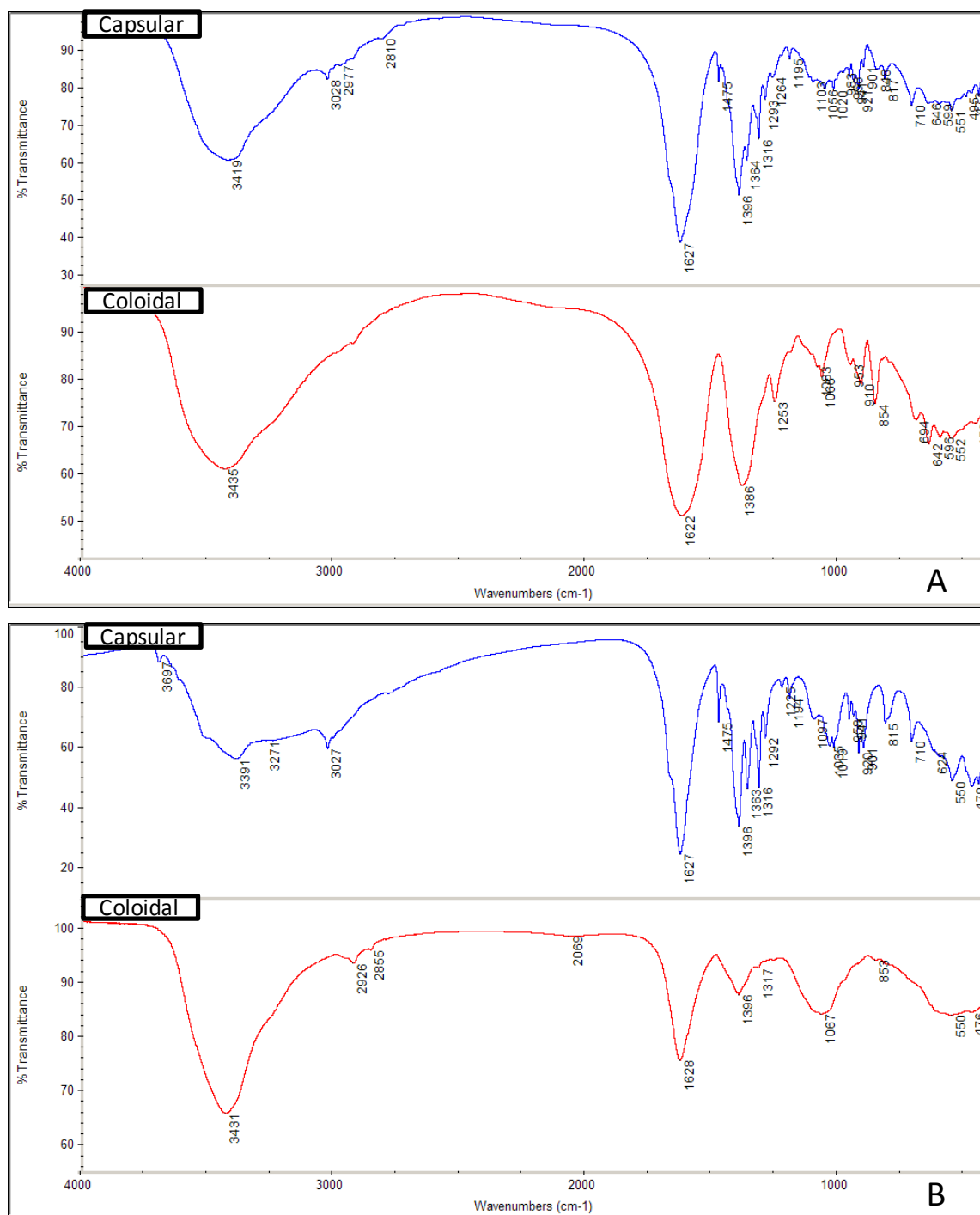


Figura 86. Espectros FTIR de las EPS (coloidal en rojo y capsular en azul) de *S. putrefaciens* crecidas en: (A) citrato férrico, y (B) mineral de gossan.

Por otro lado, los espectros FTIR correspondientes a las fracciones de EPS capsular extraídas en las distintas condiciones ensayadas fueron casi coincidentes. Principalmente, se detectaron las bandas correspondientes a los modos de vibración de

los grupos funcionales característicos de las proteínas. En el espectro, se observa, en torno a 3400 cm^{-1} , una banda ancha e intensa donde se localizan los modos de vibración de los O-H y N-H. El pico de absorción más intenso aparece a 1628 cm^{-1} y está asociado al grupo carbonilo C=O. Además, hay una banda poco intensa a 1475 cm^{-1} , correspondiente a la flexión antisimétrica del grupo NH_3^+ , y otra más intensa a 1396 cm^{-1} asignada a la flexión simétrica del mismo grupo. Cuando las células de *S. putrefaciens* crecen sobre mineral de gossan, el espectro de la fracción capsular de las EPS muestra una banda de poca intensidad en el intervalo de 1035 cm^{-1} característica de las vibraciones de tensión del enlace C-O de los polisacáridos.

La principal diferencia entre el espectro FTIR de las EPS de la fracción capsular generadas en citrato férrico soluble y sobre mineral reside en que en el espectro correspondiente al mineral se aprecia una banda a 3697 cm^{-1} , correspondiente al OH “libre” de los ácidos carboxílicos, y en la banda ancha en torno a 3300 cm^{-1} en la que se distinguen distintas bandas superpuestas, correspondientes a las vibraciones de tensión de los enlaces N-H y O-H. Probablemente, se deben a moléculas que facilitan la interacción de las células con los minerales férricos, como las flavinas, y que no son necesarias cuando el hierro se suministra como una fuente soluble.

Se puede concluir que las bandas más relevantes detectadas en el espectro EPS capsular de *S. putrefaciens* indican la presencia de proteínas. Los estudios previos de las proteínas de las biopelículas generadas por las especies de *Shewanella* ponen de manifiesto su participación en los procesos fisiológicos, ya que se han encontrado proteínas promotoras de la formación de biopelículas (BpfA), serina proteasas, nucleotidasas (CpdB y UshA), una lipasa extracelular y oligopeptidasas (Cao et al., 2011). Uno de los motivos por los que las bacterias secretan proteínas extracelulares, especialmente proteínas estructurales, podría ser debido a que tanto las proteínas como los polisacáridos extracelulares tienen un papel importante en la estabilización de las biopelículas formando uniones electrostáticas con cationes multivalentes (Laspidou and Rittmann, 2002). Además, las EPS de *Shewanella* contienen unas 20 proteínas con actividad redox. Se han detectado citocromos tipo c periplasmáticos, homólogos a MtrC y OmcA de *Shewanella oneidensis* MR-1, que actuarían como moléculas redox participando en la reducción desasimilatoria de metales y facilitando el tránsito de electrones (Cao et al., 2011)

Observación y caracterización de las biopelículas utilizando SEM y CLSM

Las células planctónicas y las fibras de carbono que podrían presentar células adheridas (sésiles) se visualizaron mediante SEM (Figuras 87a y 88). Las células planctónicas mostraron una distribución uniforme de los bacilos en la biopelícula que se confirmó mediante microscopía confocal (figura 87b).

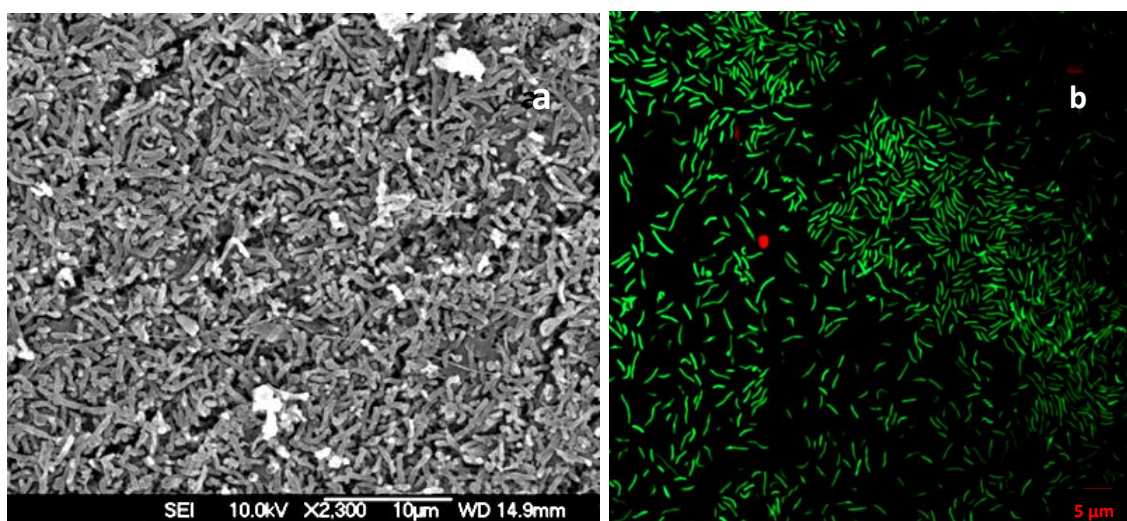


Figura 87. Células planctónicas de *S. putrefaciens*: (a) micrografías de SEM y (b) imágenes CLSM. En las imágenes de CLSM de la biopelícula para mostrar la distribución de los microorganismos en la biopelícula, los ácidos nucleicos aparecen teñidos con SYTO 9 (verde) y los carbohidratos con la lectina Con A (rojo).

Sin embargo, en la figura 88 se observa que cuando la bacteria *S. putrefaciens* se cultivó en presencia de fibras de carbono como sustrato, las células no se adherieron a la superficie del carbono. La introducción de este sustrato en el medio no indujo la formación de una biopelícula sobre él.

Puesto que el hierro, en este caso, se suministró en forma soluble como citrato, el ion férrico en disolución puede difundir fácilmente y no sería necesaria la formación de una biopelícula para llevar a cabo el proceso redox ya que existiría un contacto directo entre el Fe^{3+} y las células.

Por otro lado, se ha documentado la aplicación en pilas microbianas de distintas bacterias con capacidad para reducir metales. En estas pilas, el carbono se utiliza como electrodo (Torres et al., 2010). Puesto que la cepa *S. putrefaciens* secreta moléculas (flavinas) que actúan como lanzadera de electrones, éstas permitirían a las células realizar la transferencia electrónica sin establecer un contacto directo con el ánodo por lo que no necesitarían formar una biopelícula.

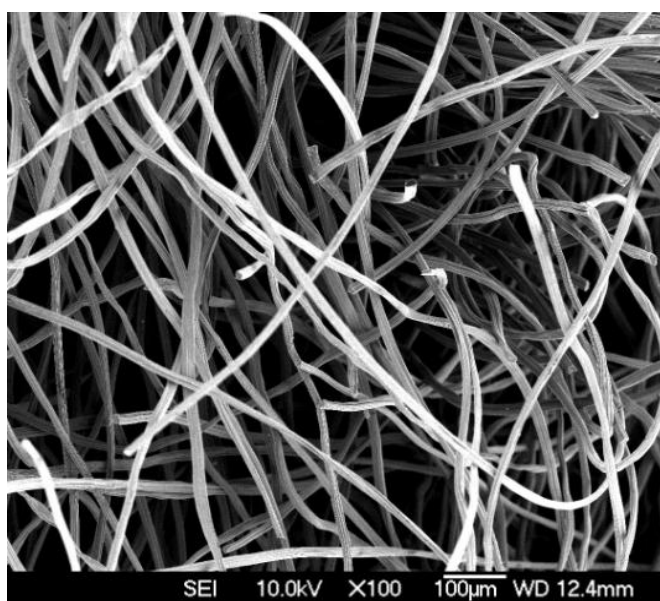


Figura 88. Micrografía de SEM de las fibras de carbono extraídas de un cultivo de *S. putrefaciens*.

Estudio de los polisacáridos extracelulares de una biopelícula sobre la superficie de mineral de gossan utilizando lectinas fluorescentes

Para analizar la composición química de los polisacáridos que constituyen la biopelícula formada por las células de *S. putrefaciens* sobre el mineral, se ensayaron diez lectinas conjugadas con FITC y TRITC, detalladas en el capítulo de “Materiales y Métodos” (apartado 3.10.8.2). De las diez lectinas conjugadas que se probaron en estos experimentos solamente dos mostraron una señal positiva: *Concanavalin A* (Con A) y

Phaseolus vulgaris agglutinin E (PHAE). Las imágenes de CLSM de la distribución de las células se muestran en la figura 89.

La figura 89A pone de manifiesto que la lectina PHAE tiñe los flóculos pero no las células. PHAE se une específicamente a residuos de galactosa Gal (β 1,4), *N*-acetilglucosamina GlcNA (β -1,2) o manosa Man (α -1,6).

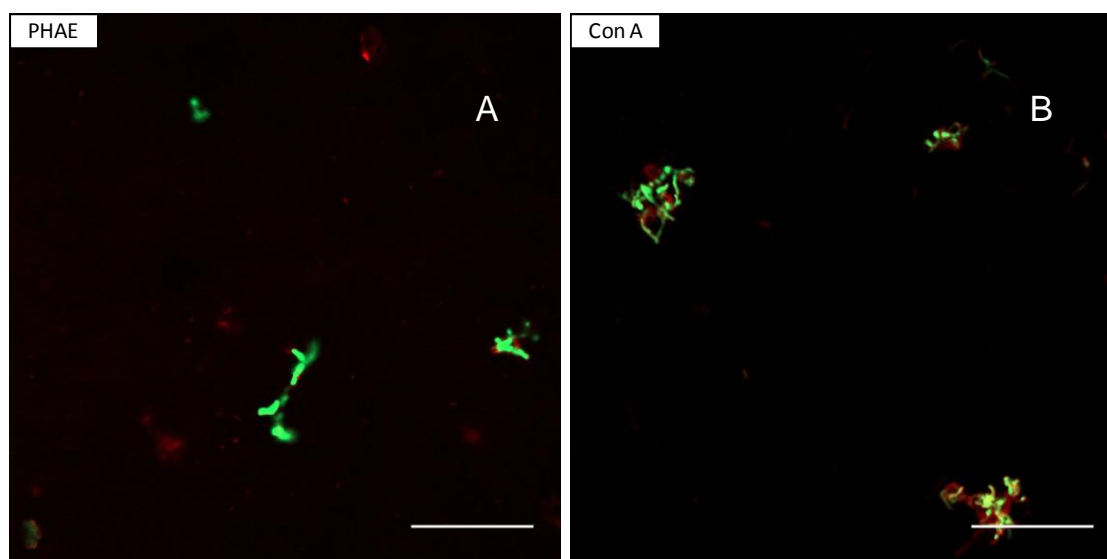


Figura 89. Imágenes CLSM de una región de la biopelícula teñida con SYTO 9 (verde), específico para ácidos nucleicos. La región fue teñida también con las lectinas conjugadas (A) PHAE-FITC, y (B) Con A-FITC, cuyas señales aparecen en rojo. Barras de escala: 20 μ m.

Además, en la figura 89B se puede apreciar que la lectina Con A tiñó los flóculos y las células. Esta lectina se une a los residuos de manosa y de glucosa de los carbohidratos presentes en los EPS secretados por los microorganismos. La manosa y la glucosa son azúcares neutros que se unen a las superficies celulares y desempeñan principalmente funciones relacionadas con la motilidad de las células y con el mantenimiento de la estructura de la biopelícula.

La biopelícula desarrollada por *S. putrefaciens* no fue muy espesa y homogénea. *Shewanella* produce moléculas que actúan como lanzadera de electrones entre las células y el mineral, concretamente flavin mononucleótido y riboflavina, que favorecen

el crecimiento en condiciones anóxicas acoplado a la reducción de hierro (Luu and Ramsay, 2003; von Canstein et al., 2008). Anteriormente, se ha demostrado que *S. putrefaciens* es capaz de utilizar moléculas presentes en el medio, como las sustancias húmicas, que llevan a cabo esta función de transferencia de electrones entre la célula y los sólidos férricos. En consecuencia, estas moléculas podrían disminuir la necesidad de formar una biopelícula.

c) Caracterización de las EPS producidas por *Aeromonas hydrophila*

En este apartado, se presentan los resultados de la caracterización de las EPS producidas por *A. hydrophila* en dos condiciones diferentes: a) crecidas con hierro férrico soluble, suministrado como citrato férrico; y b) crecidas con mineral de gossan como fuente de hierro insoluble.

Las EPS capsular y coloidal de las biopelículas se estudiaron utilizando los mismos procedimientos de extracción y purificación, y las mismas técnicas de caracterización, que en el cultivo de *S. putrefaciens*.

La lisis celular durante la extracción de las EPS se estimó mediante el análisis de la concentración de KDO en las muestras. El KDO es un componente de la membrana celular de las bacterias Gram negativas y puede utilizarse como un indicador de contaminación con compuestos del interior de la célula. La cantidad de KDO de los pellets de células, tras lisarlas con dodecilsulfato de sodio (SDS), se comparó con la cantidad presente en las EPS extraídas. El KDO en las EPS se detectó tras 9 h de extracción indicando una ruptura celular inferior al 5%. Por tanto, se concluyó que este método de extracción no conlleva una lisis celular significativa y que las EPS extraídas no se contaminaron con material intracelular.

En la figura 90 se muestra la cantidad de EPS producidas por célula en las distintas condiciones ensayadas. Se cuantificó la masa de la fracción coloidal y de la fracción capsular. Se observó que las bacterias produjeron mayor cantidad de EPS capsulares al formar biopelículas que cuando se trataba de células planctónicas. Este hecho se había

corroborado en estudios anteriores de formación de biopelículas (Cao et al., 2011; Laspidou and Rittmann, 2002). La mayor cantidad de EPS coloidal producida cuando se suministró una fuente soluble de hierro tiene su explicación en que el citrato permaneció en esta fracción tras el proceso de diálisis. Por tanto, el citrato férrico suministrado aporta su masa a la fracción coloidal de las EPS.

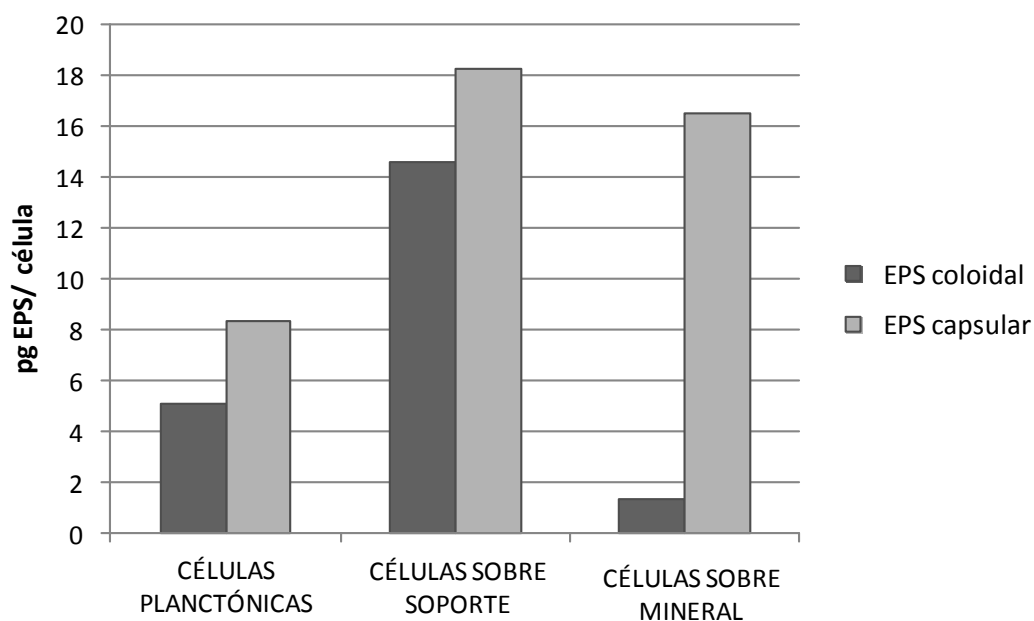


Figura 90. Cantidad de EPS producidas por célula de *A. hydrophila* bajo diferentes condiciones: células planctónicas; células crecidas sobre soporte de fibras de carbón, empleando una fuente de hierro soluble; y células crecidas sobre mineral de gossan (fuente de hierro insoluble).

Los resultados de los análisis de la composición de las EPS producidas por *A. hydrophila* en diferentes condiciones de crecimiento se recogen en la tabla 14.

Tabla 14. Composición química de las EPS producidas por *A. hydrophila* crecidas bajo diferentes condiciones.

		Composición de EPS total en % (peso/peso)		
		Carbohidratos	Proteínas	Ácidos urónicos
Células planctónicas	Coloidal	0,18	1,48	1,04
	Capsular	-	22,9	3,49
Fibras de carbono	Coloidal	0,51	2,03	0,92
	Capsular	-	27,04	2,37
Mineral gossan	Coloidal	-	7,52	0,94
	Capsular	0,43	37,77	1,75

Los análisis de las diferentes fracciones ponen de manifiesto que los componentes principales de las EPS extraídas de los cultivos de *A. hydrophila* fueron las proteínas. Sin embargo, el contenido de polisacáridos fue muy bajo. Este hecho puede tener su explicación en el perfil de transportadores de *A. hydrophila* que es comparable al de *pseudomonas* y *vibrios*, con una gran cantidad de aminoácidos y péptidos que actúan como transportadores y relativamente pocos sistemas constituidos por azúcares (Seshadri et al., 2006). *A. hydrophila* es capaz de reducir distintos metales y las proteínas podrían actuar como moléculas con actividad redox, facilitando y conduciendo el flujo de electrones, ayudando de esta forma a disminuir la toxicidad de los metales pesados o de otros compuestos presentes en las aguas contaminadas.

Los carbohidratos fueron detectados en la fracción capsular de la biopelícula formada sobre la superficie del mineral. Probablemente, los polisacáridos que forman parte de la matriz de la biopelícula contribuyen a la estabilidad mecánica de ésta y determinan su arquitectura.

Las EPS producidas por *A. hydrophila* también contienen ácidos urónicos. Estas moléculas polares podrían promover la formación de geles de polisacáridos, el intercambio iónico, la formación de minerales y la acumulación de metales tóxicos. Además, los grupos funcionales cargados de los ácidos urónicos son capaces de complejar los cationes metálicos.

Caracterización de las EPS mediante FTIR

Las EPS aisladas de *A. hydrophila* se analizaron mediante espectroscopia FTIR. En la figura 91A se muestran los espectros de las EPS producidas por las células crecidas utilizando citrato férrico como fuente de hierro soluble y en la figura 91B los correspondientes a las EPS generadas por las células crecidas con mineral gossan como fuente insoluble de Fe(III).

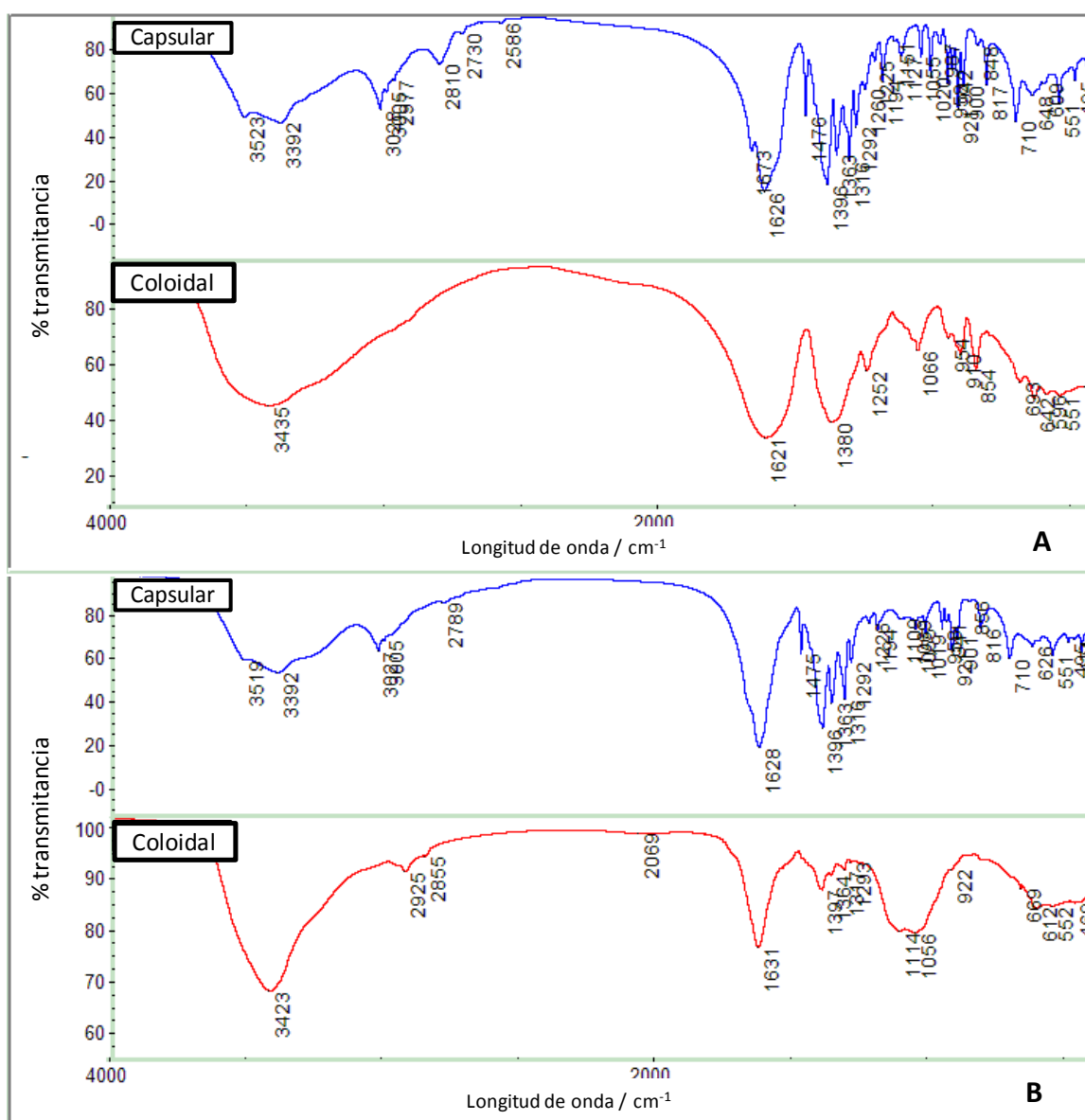


Figura 91. Espectros FTIR de EPS (coloidal en rojo y capsular en azul) de *A. hydrophila* crecidas en: (A) citrato férrico y (B) mineral de gossan como aceptor de electrones.

Los espectros de las fracciones coloidales fueron muy diferentes en las dos condiciones ensayadas. El espectro de las EPS coloidales de las células crecidas con citrato férrico reveló la presencia de dos bandas muy intensas a 1621 y 1380 cm^{-1} . La primera es característica de las vibraciones de tensión antisimétrica del grupo COO^- de los aniones carboxilato y la segunda se corresponde con las vibraciones de tensión simétrica. Estas bandas son debidas a la presencia de citrato en el medio. Como se evidenció anteriormente, *A. hydrophila* utiliza el lactato como fuente de energía y no el citrato, permaneciendo éste en el medio. Adicionalmente, destaca la presencia de una banda ancha e intensa a 3435 cm^{-1} que se atribuye a los modos de vibración de tensión O–H en el grupo funcional hidroxilo y a las vibraciones de tensión N–H en amidas y aminas. Esta banda ancha a ~3400 cm^{-1} también se observó en el espectro de las EPS coloidales de las células crecidas con mineral.

En relación a las EPS coloidales producidas por las células en presencia del mineral gossan, el espectro FTIR presentó un pico de absorción a 1631 cm^{-1} , correspondiente a la banda amida I, y otro a 1397 cm^{-1} que se asigna a la vibración de tensión del enlace C–N. Además, las dos bandas registradas a 1114 y 1056 cm^{-1} podrían ser asignadas a los modos de vibración de tensión C–O de los alcoholes. Por lo tanto, el espectro de las EPS coloidales de células de *A. hydrophila* crecidas con mineral reveló la presencia de varios grupos funcionales característicos, principalmente, de las proteínas.

Por otro lado, no hubo diferencias apreciables entre los espectros de FTIR de las EPS de la fracción capsular de las células crecidas con una fuente de hierro soluble e insoluble. En ambos se detectaron las vibraciones C–O de las estructuras de oligo- y polisacáridos y de grupos carboxilato. El espectro mostró un pico de absorción en torno a 3520 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de tensión del O–H “libre” del grupo carboxílico y otro a 3392 cm^{-1} correspondiente a la vibración del O–H asociado. La banda de los modos de vibración de tensión C–H de las cadenas hidrocarbonadas apareció a 2977 cm^{-1} , y la vibración de tensión =CH de los alquenos a 3028 cm^{-1} . Los análisis de FTIR de las EPS capsulares revelaron la presencia de tres bandas intensas a 1630, 1475 y 1396 cm^{-1} . Las dos primeras son características de las bandas amida I y II, respectivamente. La banda del espectro a 1396 cm^{-1} correspondería a las vibraciones de tensión C–N. Por lo tanto, las bandas más relevantes del espectro de las EPS capsulares de *A. hydrophila* están relacionadas con la presencia de proteínas. Las bacterias que

llevan a cabo una reducción desasimilatoria de metales son capaces de catalizar, directa o indirectamente, la reducción de iones metálicos como Fe(III) y Mn(IV). Estos resultados confirman que las EPS contienen moléculas con actividad redox, tales como citocromos, que favorecen la transferencia electrónica (Summers et al., 2010).

Las bandas de absorción características del espectro no permiten un análisis cuantitativo ya que las bandas de los distintos grupos funcionales se solapan. No obstante, los análisis químicos realizados para cuantificar el contenido de proteínas y carbohidratos (Tabla 14) fueron consistentes con los grupos funcionales identificados mediante las medidas de FTIR.

Análisis proteómico de las EPS

En la tabla 15 se recogen las cuatro proteínas más abundantes identificadas en la fracción capsular de las mismas. La mayoría de ellas se identificaron con proteínas de la especie *Aeromonas*. La identificación de proteínas de las EPS generadas sobre fibras de carbono puso de manifiesto el éxito de la extracción de las EPS. Las proteínas identificadas están vinculadas a funciones de adhesión a superficies y al metabolismo anaerobio de *A. hydrophila*.

Tabla 15. Proteínas extracelulares de la fracción capsular de las EPS.

Accession number	Masa (KDa)	Descripción	Organismo
gi_330829347	85,5	Formiato acetiltransferasa I	<i>Aeromonas veroni</i> B565
gi_270341193	28,8	Factor de elongación Tu	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
gi_117620869	35,3	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
gi_187928221	32,3	Regulador transcripcional LysR	<i>Ralstonia picketti</i> 12J

La enzima formiato acetiltransferasa I es clave en el metabolismo de fermentación y se activa con Fe²⁺ (Gao et al., 2013). Además, esta proteína está asociada probablemente a

la formación de biopelículas en ambientes donde experimentan fuerzas motrices bajas. El interior de la matriz extracelular se caracteriza por una disponibilidad limitada de nutrientes y, en consecuencia, hay un metabolismo alterado donde la formiato acetiltransferasa podría expresarse como respuesta (Castro et al., 2011).

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, cuando se localiza extracelularmente, se considera una proteína glicolítica que interviene en la producción de energía. Sin embargo, se le han atribuido otras funciones a esta enzima más allá de su papel en el metabolismo. Esta proteína también puede actuar como activador plasminógeno (Chromy et al., 2005; Pancholi and Chhatwal, 2003). Entre las múltiples funciones que puede desempeñar se incluyen las uniones a través de microtubos y el transporte a través de la membrana (Sirover, 1999); por ello, podría estar relacionada con la formación de los nanohilos observados en la biopelícula de *A. hydrophila*.

Tanto las proteínas como los polisacáridos extracelulares juegan un papel importante en la estabilización de la estructura de las biopelículas mediante la formación de uniones electrostáticas con cationes multivalentes. Las proteínas podrían estar más ligadas que los polisacáridos a estas uniones electrostáticas en las biopelículas ya que están compuestas por aminoácidos con un contenido relativamente alto de cargas negativas (Laspidou and Rittmann, 2002). Esta podría ser una de las razones por la que las células secretan proteínas en las EPS, especialmente proteínas estructurales como, por ejemplo, el factor de elongación Tu identificado en *A. hydrophila*. La presencia de este factor Tu en la superficie de algunos microorganismos ya ha sido documentada por distintos investigadores. Generalmente, son proteínas extracelulares de microorganismos patógenos que se unen a plaminógenos (Granato et al., 2004; Xolalpa et al., 2007). En este caso, el factor de elongación Tu podría mediar en la adhesión celular de *A. hydrophila* a las superficies sólidas.

La familia de reguladores transcripcionales LysR es el tipo más abundante en los procariotas. La conservación de estos reguladores en el genoma de diferentes bacterias significa que su papel regulador de genes ha evolucionado de forma similar para realizar distintas funciones cuyos productos pueden estar implicados en el metabolismo, tales como: la división celular, el *quorum sensing*, la virulencia, la motilidad, la adhesión y la secreción, entre otras (Maddocks and Oyston, 2008).

Aunque serían necesarios más estudios de aislamiento e identificación, se puede concluir que las proteínas presentes en las EPS de *A. hydrophila* desempeñan papeles importantes en el metabolismo, en la transferencia electrónica extracelular, en la adhesión bacteriana o en mecanismos de respuesta a determinadas condiciones ambientales.

Observación y caracterización de las biopelículas utilizando SEM y CLSM

Las células de *A. hydrophila*, planctónicas y adheridas a un soporte sólido, de carbono o mineral, se visualizaron mediante SEM (Figura 92 A, C, E). Las células planctónicas y las células sésiles presentaron notables diferencias en su apariencia general. El aspecto más destacado fue la unión de las células a la superficie de carbono mediante filamentos que se pueden ver en la figura 92C. Estos hilos nanométricos no sólo aparecieron entre las bacterias y la superficie del soporte, sino también entre las propias células, interconectándolas. Algunos investigadores han sugerido que ciertos pili bacterianos especializados actuarían como conductores de electrones desde la membrana citoplasmática a los aceptores durante la respiración (Reguera et al., 2005). Los estudios sobre especies bacterianas como *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oneidensis*, que reducen metales incluyendo Fe(III) y Mn(IV), indican que estos “nanocables” jugarían un papel en la comunicación entre los microorganismos basándose en que los filamentos interconectan las células (Gorby et al., 2006; Reguera et al., 2005).

En la imagen de SEM que se presenta en la figura 92E se observa la presencia de EPS sobre el mineral. La biopelícula bacteriana formó un recubrimiento discontinuo sobre la superficie de las partículas de mineral y, en algunas zonas, las EPS forman “puentes” orgánicos que unen las partículas contiguas.

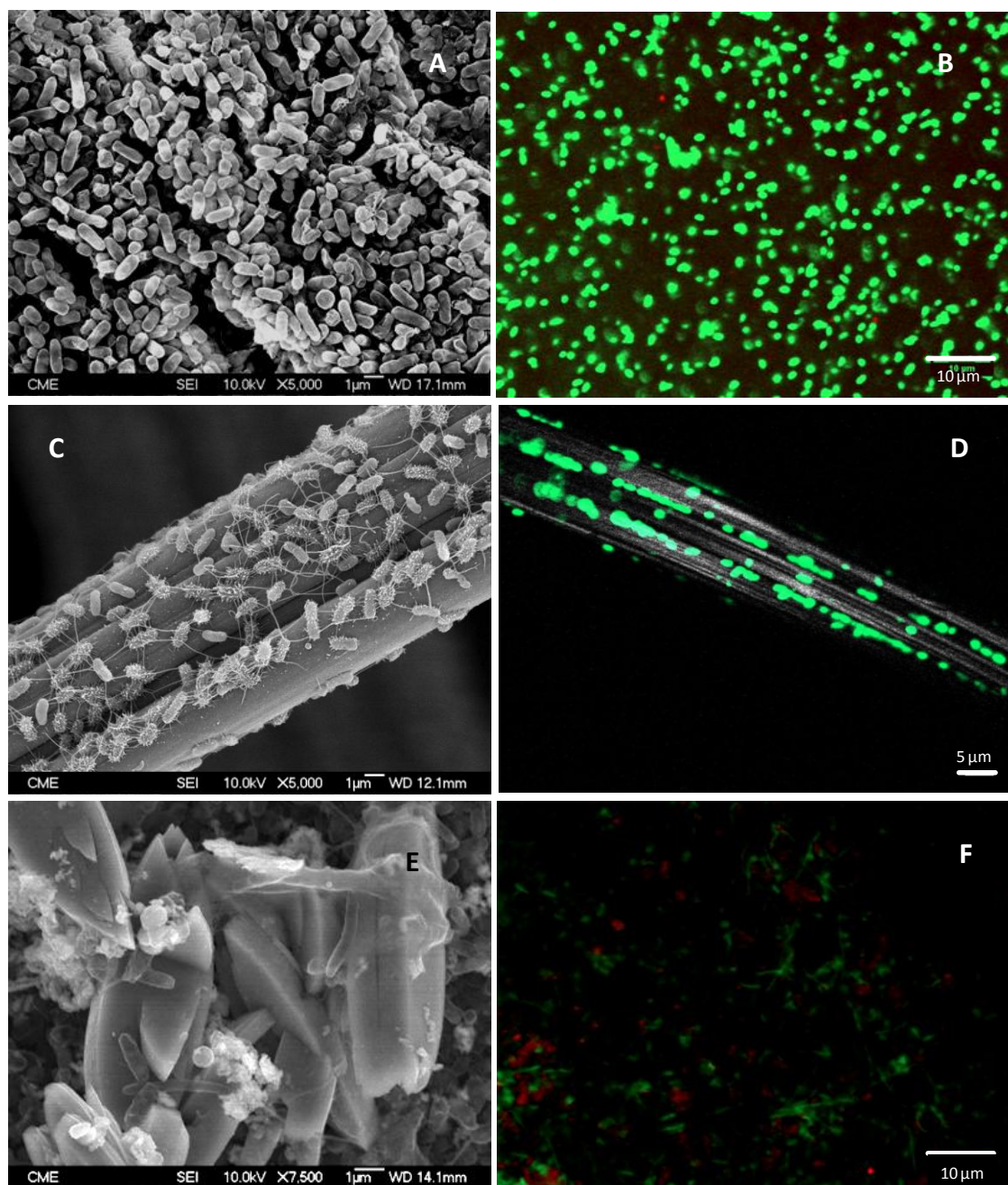


Figura 92. Imágenes de SEM y CLSM de *A. hydrophila*: células planctónicas (A, D), células adheridas a fibras de carbono (B, E) y células sobre mineral de goethita (C, F). En las imágenes de CLSM de la biopelícula se muestra la distribución de las células mediante la tinción de los ácidos nucleicos con SYTO 9 (verde). Los carbohidratos se tiñeron con la lectina Con A (rojo).

Las células planctónicas, las células adheridas a la superficie de carbono y las células cultivadas en el mineral y sus biopelículas tiñeron con tintes fluorescentes y se analizaron mediante CLSM. Esta técnica permitió la observación de las muestras hidratadas manteniendo la forma y estructura originales de las células y de las EPS. Las

imágenes obtenidas en cada caso se presentan en las figuras 92 B, D, F. Los ácidos nucleicos se tiñeron con SYTO 9 (verde), lo que permitió observar la distribución celular en la biopelícula. La lectina Con A conjugada con un marcador fluorescente (rojo) se utilizó para visualizar los exopolisacáridos de la biopelícula. De acuerdo con los análisis colorimétricos de la composición de las EPS, los carbohidratos se observaron en las EPS producidas sobre el mineral gossan.

Estudio de los polisacáridos extracelulares de una biopelícula sobre la superficie de mineral de gossan utilizando lectinas fluorescentes

Con el fin de analizar la composición de los polisacáridos de la biopelícula formada por *A. hydrophila* sobre el mineral gossan, se ensayaron 10 lectinas diferentes conjugadas con FITC y TRITC. Las imágenes obtenidas mediante CLSM pusieron de manifiesto su compleja composición química, como se puede observar en la figura 93. Sólo cuatro de las lectinas empleadas dieron una respuesta positiva: *Canavalia ensiformis* (Con A), *Erythrina cristagalli* (ECA), *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA I), y Soybean agglutinin (SBA).

La figura 93 muestra también la combinación de dos tinciones diferentes aplicadas secuencialmente a la misma zona de la biopelícula: las lectinas (Con A, ECA, UEA I and SBA), unidas a residuos específicos de los polisacáridos, y SYTO 62, para los ácidos nucleicos. Las áreas a las que no se unió ninguna tinción aparecieron en negro, las células se visualizaron en rojo y los residuos unidos a las lectinas en verde. La superposición de ambas tinciones se observaron de color amarillo.

La tinción de los ácidos nucleicos reveló una distribución uniforme de las células sobre la superficie del mineral. Las lectinas Con A, ECA y UEA I tiñeron los flóculos en el cultivo pero no tiñeron las células (Figura 92A, B y C).

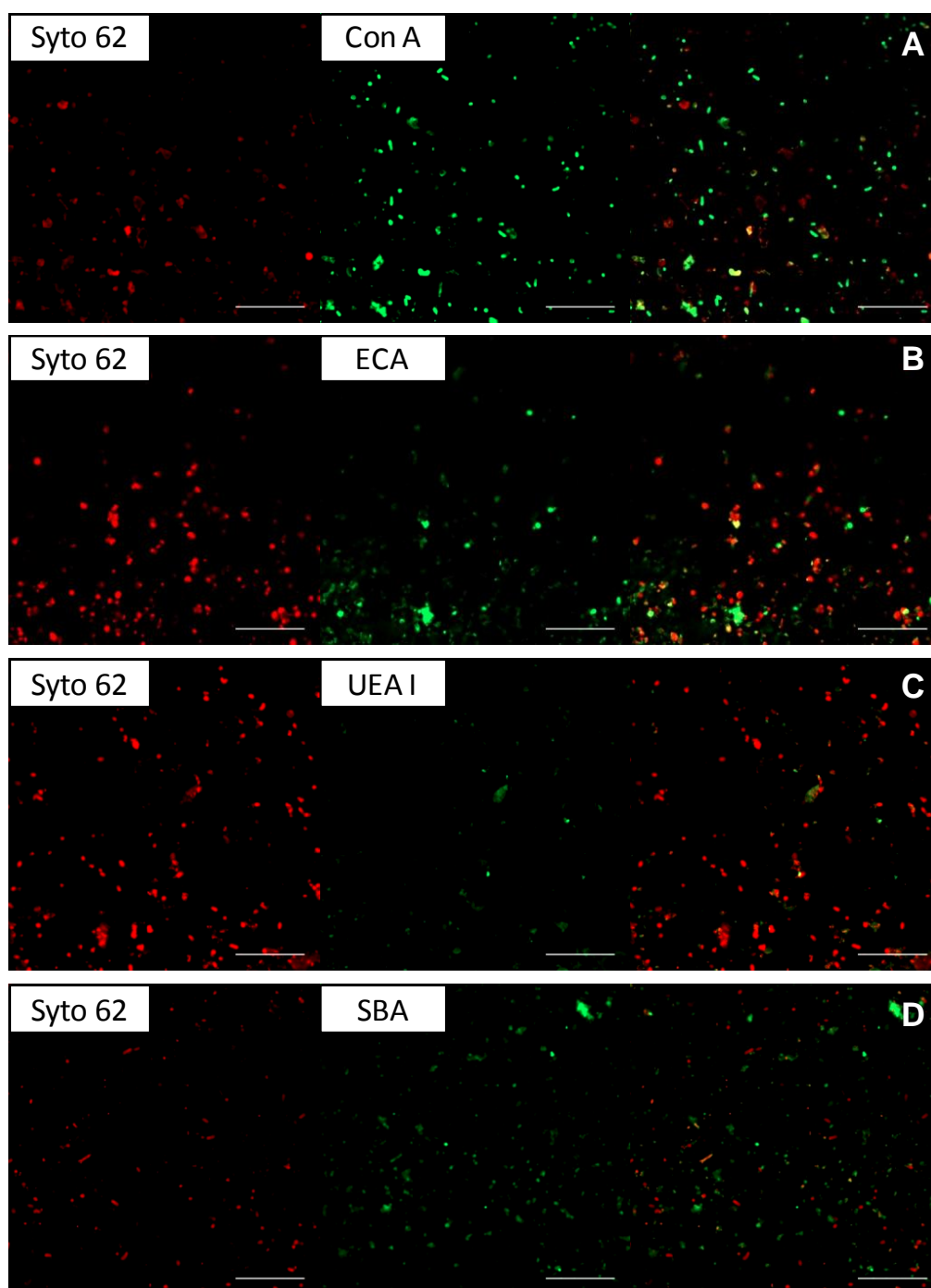


Figura 93. Imágenes de CLSM de una región de la biopelícula producida por *A. hydrophila* sobre mineral gossan teñida con SYTO 62, tinte específico para ácidos nucleicos (rojo). La región se tiñó también con varias lectinas (verde): (A) Con A-FITC, (B) ECA-FITC, (C) UEA I-FITC, y (D) SBA-FITC. La última columna muestra una combinación de las dos señales. Barras de escala: 10 μm.

La visualización de la señal correspondiente a la lectina Con A se debió a su unión a los residuos terminales manosil y glucosil que estarían presentes en la biopelícula

desarrollada por los microorganismos. La manosa y la glucosa se encuentran en polisacáridos que contribuyen a la adherencia celular a superficies abióticas y bióticas y participan en el mantenimiento de la estructura de la biopelícula, se anclan a la superficie de la bacteria y, posiblemente, promueven las interacciones célula-célula (Ghafoor et al., 2011). La lectina UEA I es específica para fucosa y la lectina ECA se une a galactosa y *N*-acetilglucosamina. Los polisacáridos extracelulares generados por las bacterias que contienen fucosa han sido muy estudiados y entre ellos se incluyen el ácido colánico, el fucogel y el clavan (Freitas et al., 2011). El ácido colánico es un polisacárido compuesto por fucosa, glucosa, galactosa y ácido glucurónico. El fucogel se compone de galactosa, ácido 4-*O*-acetil-galacturónico. El clavan está compuesto por glucosa, galactosa y fucosa.

La lectina SBA tiñó tanto los flóculos como las células (Figura 93D). Esta lectina dio una señal positiva indicando su unión a los residuos α -*N*-acetilgalactosamina presentes en las EPS. El hecho de que la lectina SBA apareciese sobre las células indica que, posiblemente, algunas proteínas capsulares de *A. hydrophila* son glicoproteínas que contienen como residuo terminal GalNAc. La glicosilación de las proteínas se ha observado en otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Brimer and Montie, 1998), *Borrelia burgdorferi* (Ge et al., 1998) y *Campylobacter jejuni* (Linton et al., 2002).

d) Nanohilos conductores en *Aeromonas hydrophila*

En el estudio de la reducción microbiológica de las distintas jarositas, se observó la formación de pili durante el crecimiento de *A. hydrophila* en presencia de minerales de Fe(III). La micrografía de TEM (Figura 94) pone de manifiesto la conexión entre las células y las partículas del mineral de gossan a través de filamentos durante el proceso de reducción de hierro. Este hecho sugiere que puede existir un mecanismo para la transferencia de electrones, alternativo al mecanismo de contacto directo.

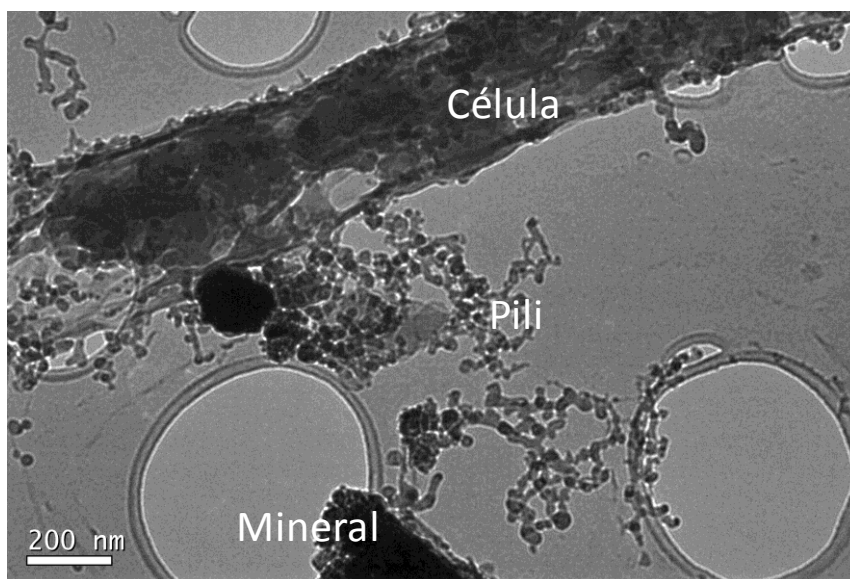


Figura 94. Micrografía de TEM de las células de *A. hydrophila* cultivadas con minerales de gossan como único aceptor de electrones.

La posibilidad de que las bacterias reductoras de metales utilicen un material extracelular sólido conductor o semiconductor para la transferencia electrónica ha sido poco investigada. Hay evidencias de que algunos pili bacterianos son conductores eléctricos que pueden actuar como “cables” para favorecer el transporte de electrones hacia los metales aceptores durante la respiración de las células (Gorby et al., 2006; Reguera et al., 2005).

También se observó la formación de nanohilos cuando *A. hydrophila* creció sobre fibras de carbono como soporte sólido. Las interacciones entre microorganismos y electrodos

pueden aplicarse a procesos bio-electroquímicos que tienen gran interés por su contribución en el desarrollo de pilas microbianas de combustible y de procesos de biorremediación.

Algunas bacterias llevan a cabo reacciones anódicas o catódicas empleando electrodos, principalmente grafito, como dadores o aceptores de electrones, respectivamente. Las bacterias reductoras de hierro vía desasimilatoria, como *Shewanella* y *Geobacter*, oxidan compuestos orgánicos y transfieren los electrones a los ánodos, obteniéndose como resultado final la generación de corriente eléctrica en las denominadas pilas bacterianas. En este caso, el transporte de los electrones a través de una matriz sólida conductora podría repercutir en la obtención de altas densidades de corriente y pocas pérdidas de potencial en el ánodo (Kim et al., 2002; Reguera et al., 2006; Torres et al., 2010).

Por lo tanto, un mejor conocimiento del efecto de la naturaleza del sustrato en la formación de los nanohilos producidos por *A. hydrophila*, de la naturaleza y de las propiedades conductoras de estos hilos bacterianos, así como de la posibilidad de regular su producción, son aspectos de gran interés, tanto por su contribución al estudio del mecanismo de biorreducción de los minerales de Fe(III) como por sus potenciales aplicaciones en diferentes aplicaciones biotecnológicas.

Efecto de la naturaleza del sustrato en la adhesión celular y en la formación de nanohilos

Los minerales semiconductores y conductores, como la pirita, la magnetita y la hematita, abundan en los suelos naturales y en los sedimentos y pueden contribuir a acoplar las reacciones biogeoquímicas (Kato et al., 2012). Con el fin de determinar si la naturaleza del sustrato tiene un efecto directo en la adhesión celular y en la producción de pilis por *A. hydrophila*, se realizaron experimentos de crecimiento de esta bacteria con citrato férrico (fuente de hierro soluble) y sobre tres soportes diferentes con diferentes propiedades conductoras: láminas de vidrio (aislante), pirita (semiconductor) y grafito (conductor).

Las imágenes SEM de la figura 95 muestran que la formación de los filamentos bacterianos tuvo lugar en las distintas superficies en presencia de Fe(III) soluble como aceptor de electrones: sobre láminas de vidrio (Figura 95A), sobre cupones de pirita (Figura 95B) y sobre grafito (*highly ordered pyrolytic graphite*, HOPG) (Figura 95C y 95D).

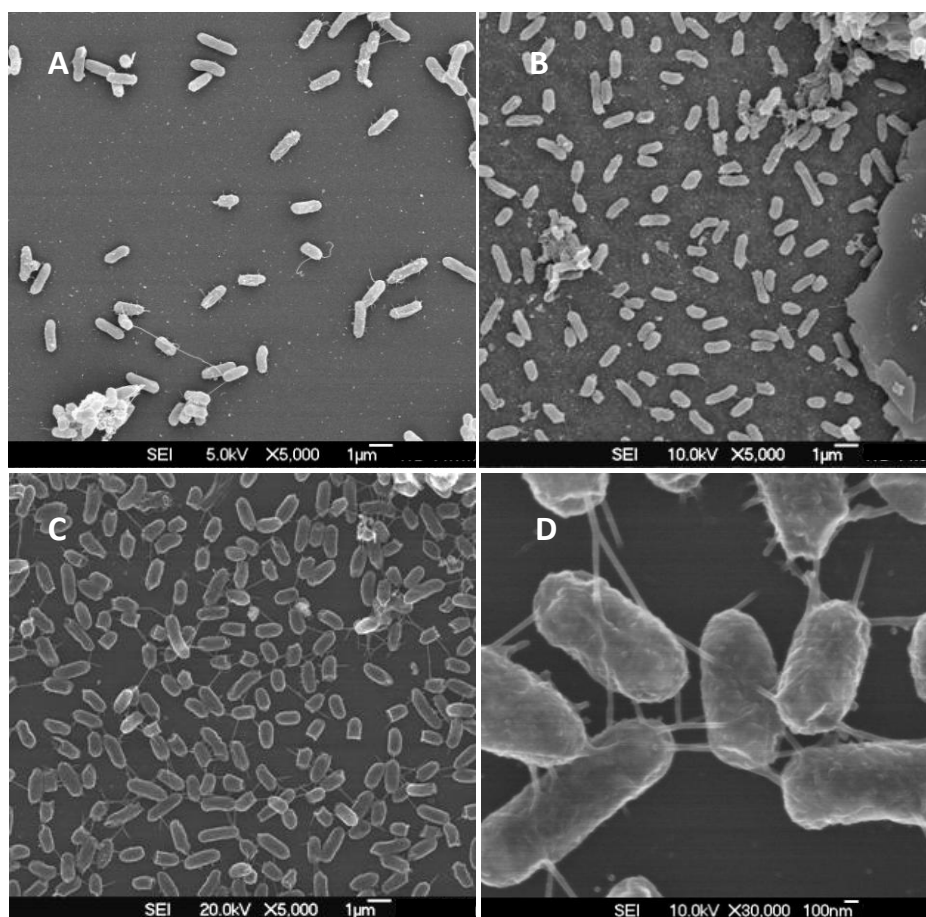
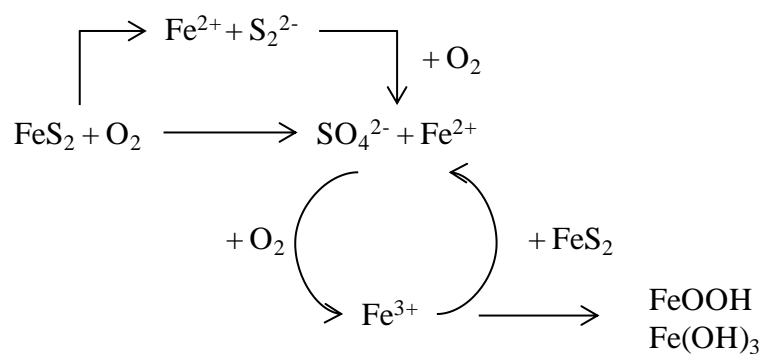


Figura 95. Efecto del sustrato en la producción de nanohilos por *A. hydrophila*. Micrografías de SEM de células crecidas con citrato férrico soluble sobre: (A) láminas de vidrio, (B) pirita, (C) HOPG y (D) detalle de los nanohilos interconectando las células de la imagen C.

Los resultados obtenidos muestran que la naturaleza del soporte parece crucial para la adhesión superficial de las bacterias y para la formación de nanohilos. Se observó una correlación positiva entre el número de filamentos y la conductividad de cada sustrato. Se produjo un aumento de la densidad de células de *A. hydrophila* sobre el soporte en superficies muy conductoras como es el caso del grafito. Además, las células están con

frecuencia interconectadas (Figura 95D). Este hecho posibilitaría la transferencia de electrones entre las células a través de los pili.

Por otro lado, la adhesión bacteriana a los diferentes soportes se ve influida por la intervención de distintas fuerzas que modifican la naturaleza hidrófoba o hidrófila de las superficies entre las que destacan: las fuerzas de largo alcance, como interacciones hidrofílicas, electrostáticas o de van der Waals, y las fuerzas de corto alcance, como los enlaces de hidrógeno (Guo et al., 2013). El grafito y la pirita presentan hidrofobicidad natural. Al estar en contacto con el oxígeno, la superficie de la pirita se oxida y se forman oxihidróxidos que hacen que la hidrofobicidad de dicha superficie disminuya y que ésta resulte más atractiva para las bacterias. Las reacciones implicadas en la oxidación superficial de la pirita se muestran a continuación.



La superficie de la sílice y de los vidriosilicatos en agua adquiere una densidad de carga negativa debido a la disociación de los grupos silanol terminales. Esto podría hacer que las bacterias planctónicas se aproximasen por interacciones hidrofílicas; sin embargo, como las superficies celulares normalmente tienen carga negativa a pH neutro, la superficie del vidrio resultó menos atractiva para las bacterias debido a las fuerzas electrostáticas. Aunque el punto isoeléctrico del HOPG está por debajo del pH 3, a valores de pH superiores hay una distribución de puntos en la superficie con densidad de carga positiva, debido a la adsorción de iones hidronio, que probablemente favorecen la adhesión de las células (Koestner et al., 2011). En consecuencia, parece que la densidad de carga superficial de los sustratos tiene influencia sobre la adhesión de las células de *A. hydrophila* a los distintos soportes ensayados explicando la menor afinidad de la bacteria por las superficies de vidrio, mientras que la superficie del carbono orientado aparece cubierta de un gran número de microorganismos.

Naturaleza de los nanohilos

El genoma secuenciado de *A. hydrophila* ATCC 7966 codifica varios genes, probablemente, implicados en la formación de estructuras superficiales como pilis y adhesinas, las cuales podrían estar involucradas en la adhesión celular. Además de los pilis tipo IV, ya caracterizados de *Aeromonas*, al menos 5 clusters de genes codificarían potencialmente nuevos pilis (Seshadri et al., 2006).

En cuanto a la naturaleza de estos filamentos conductores algunos investigadores han sugerido que contienen proteínas pero aparentemente la composición difiere entre géneros. *Geobacter* produce pilis conductores que no contienen proteínas transportadoras de electrones (Klimes et al., 2010). *Shewanella* produce unas complejas asociaciones que contienen citocromos (MtrC) y proteínas estructurales (pili tipo IV).

En los estudios anteriormente realizados de la biopelícula de *A. hydrophila*, se observó que los nanohilos no se teñían con lectinas, lo que indica que no están formados por polisacáridos. Además, los componentes mayoritarios de las EPS fueron las proteínas. Ambos hechos parecen indicar que la naturaleza de los nanohilos es proteica.

Para profundizar en la caracterización de los nanohilos de *A. hydrophila* y determinar su naturaleza, se llevó a cabo el aislamiento y la purificación de las proteínas extracelulares que forman los pilis producidos por esta bacteria. Con este objetivo, se realizó un gel SDS-PAGE de las proteínas precipitadas de la fracción de EPS coloidal, débilmente asociada a las células. Se obtuvieron 11 bandas candidatas que fueron identificadas posteriormente mediante espectroscopía de masas (Figura 96).

Sólo en dos de las bandas, 1 y 11, no hay ningún resultado significativo. En algunos casos hubo mezcla de proteínas y por eso se tuvo que hacer fragmentación de péptidos. Las proteínas identificadas se muestran en la tabla 16.

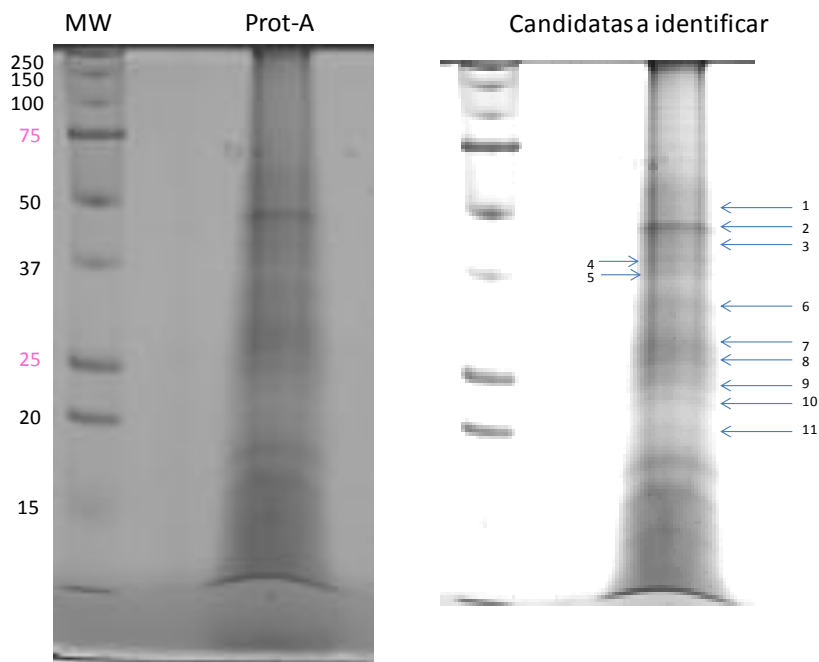


Figura 96. Gel SDS–PAGE de las proteínas extracelulares de *A. hydrophila* débilmente asociadas a la célula. Los números indican las bandas seleccionadas para su identificación.

Tabla 16. Proteínas extracelulares de la fracción capsular de las EPS débilmente unidas a la célula.

Accession number	Masa (KDa)	Descripción	Organismo
gi_117617738	43,5	Factor de elongación Tu	Aeromonas hydrophila ATCC 7966
gi_117619246	36,3	RNA polimerasa DNA dirigida subunidad α	Aeromonas hydrophila ATCC 7966
gi_117617738	43,5	Factor de elongación Tu	
gi_117621197	40,7	Fosfoglicerato quinasa	
gi_117620869	35,4	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	
gi_117619723	39,1	Fructosa bifosfato aldolasa	Aeromonas hydrophila ATCC 7966
gi_117620869	35,4	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	
gi_117618219	35,1	Proteína de membrana externa OmpAII	Aeromonas hydrophila ATCC 7966
gi_117618174	24,6	50S proteína ribosomal L1	Aeromonas hydrophila ATCC 7966
gi_117618638	23,5	30S proteína ribosomal S4	Aeromonas hydrophila ATCC 7966
gi_53759099	22,1	Antioxidante	Aeromonas hydrophila ATCC 7966
gi_117619168	20,4	50S proteína ribosomal L5	Aeromonas hydrophila ATCC 7966

El genoma secuenciado de *A. hydrophila* ATCC 7966 codifica varios genes implicados en la formación de estructuras superficiales como pilis o fimbrias y adhesinas, que probablemente intervienen en la adhesión celular. Además, se han caracterizado los pilis tipo IV de *Aeromonas* y hay al menos 5 clusters de genes que codificarían otros tipos de pilis (Seshadri et al., 2006).

En este experimento preliminar, se han extraído algunas proteínas de las EPS de *Aeromonas* A. Las pilinas o sus componentes no se han identificado tras la secuenciación de la espectrometría de masa de las bandas principales.

Aunque en este caso no se han encontrado pilinas, se ha publicado que los nanohilos conductores de la bacteria reductora de hierro *Geobacter sulfurreducens* son pilis tipo IV (Malvankar and Lovley, 2014; Reguera et al., 2005). Parece que son los aminoácidos aromáticos específicos en el carboxilo terminal de la proteína PilA de *G. sulfurreducens* los que les confieren la conductividad (Vargas et al., 2013).

La mayoría de los sistemas de secreción tipo IV constan de tres subestructuras: adhesinas y/o pilis que intervienen en el contacto entre células, un canal de secreción a través de la envoltura celular bacteriana y una proteína que actúa como receptor en la entrada del canal de secreción (Hayes et al., 2010).

La posición expuesta de proteína de membrana externa OmpA en la pared celular podría indicar su función como receptora específica de los pilis. Se trata de una proteína transmembrana constituida por láminas β que estabiliza la membrana y participa en la conjugación bacteriana (Pautsch and Schulz, 1998). Aunque los receptores son difíciles de identificar, se ha observado que las cepas sin la proteína OmpA presentan una menor eficiencia en el acoplamiento entre células a través de pilis (Anthony et al., 1994; Seltsmann and Holst, 2002).

El factor de elongación Tu se ha detectado extracelularmente vinculado a la adhesión celular (Balasubramanian et al., 2009; Granato et al., 2004). El factor de elongación de *M. pneumoniae* interviene en la unión a la fibronectina de la matriz celular a través del carboxilo del factor de elongación Tu (Balasubramanian et al., 2008). También se han encontrado proteínas del factor de elongación Tu en otros microorganismos como *Lactobacillus johnsonii*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*, que se

unen a mucina, fibrinógeno, plasminógeno y factor H (Balasubramanian et al., 2009). El factor de elongación Tu se ha extraído de la pared celular de *L. johnsonii* La1 y se ha identificado como una adhesina (Granato et al., 2004).

La función del antioxidante es la inhibición de las reacciones provocadas por oxígeno o por peróxidos. Por lo general, el antioxidante es eficaz, ya que puede ser en sí mismo más fácilmente oxidado que la sustancia protegida (Zhang et al., 2000). En consecuencia podría estar implicado en la transferencia electrónica a través de estos nanohilos.

Estos resultados demostrarían que hay varias proteínas involucradas en la formación de los nanohilos, aunque es necesario realizar un estudio más completo de aislamiento e identificación.

Conductividad de los nanohilos bacterianos

Las muestras de células con nanohilos extracelulares procedentes de cultivos crecidos sobre la superficie de HOPG se examinaron mediante AFM con el objetivo de evaluar su capacidad para conducir corriente eléctrica. En primer lugar, se obtuvo una imagen de la topografía de la superficie del grafito y se comprobó la presencia de células y de filamentos bacterianos (Figura 97A). Paralelamente, la figura 97B muestra una imagen de conductividad. La corriente evidenció contrastes entre las distintas regiones. Las áreas blancas se corresponden con el soporte de HOPG. Las células y los filamentos también dan una respuesta de corriente como material conductor.

El microscopio de fuerza atómica, operado en modo de contacto intermitente y fuerza máxima (*peak force tapping mode*), puso de manifiesto la existencia de numerosos nanohilos bacterianos de gran longitud (Figura 98A). Se midieron las dimensiones del perfil de estos filamentos situados de forma aislada sobre la superficie del grafito. Su anchura osciló entre 50 y 150 nm, mientras que su altura sobre la superficie del grafito fue de aproximadamente 10 nm (Figura 98B).

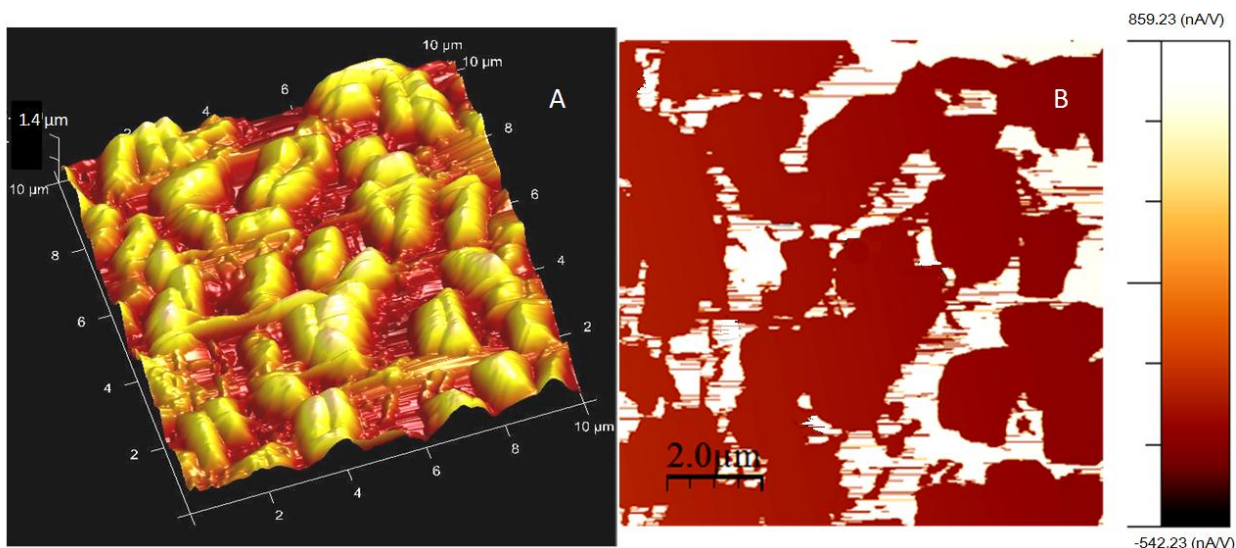


Figura 97. (A) Imagen de AFM de la topografía de las células de *A. hydrophila* y de sus filamentos sobre HOPG. (B) Imagen de corriente obtenida mediante CP-AFM del mismo campo mostrado en la imagen A, al aplicar una diferencia de potencial entre la punta y la muestra.

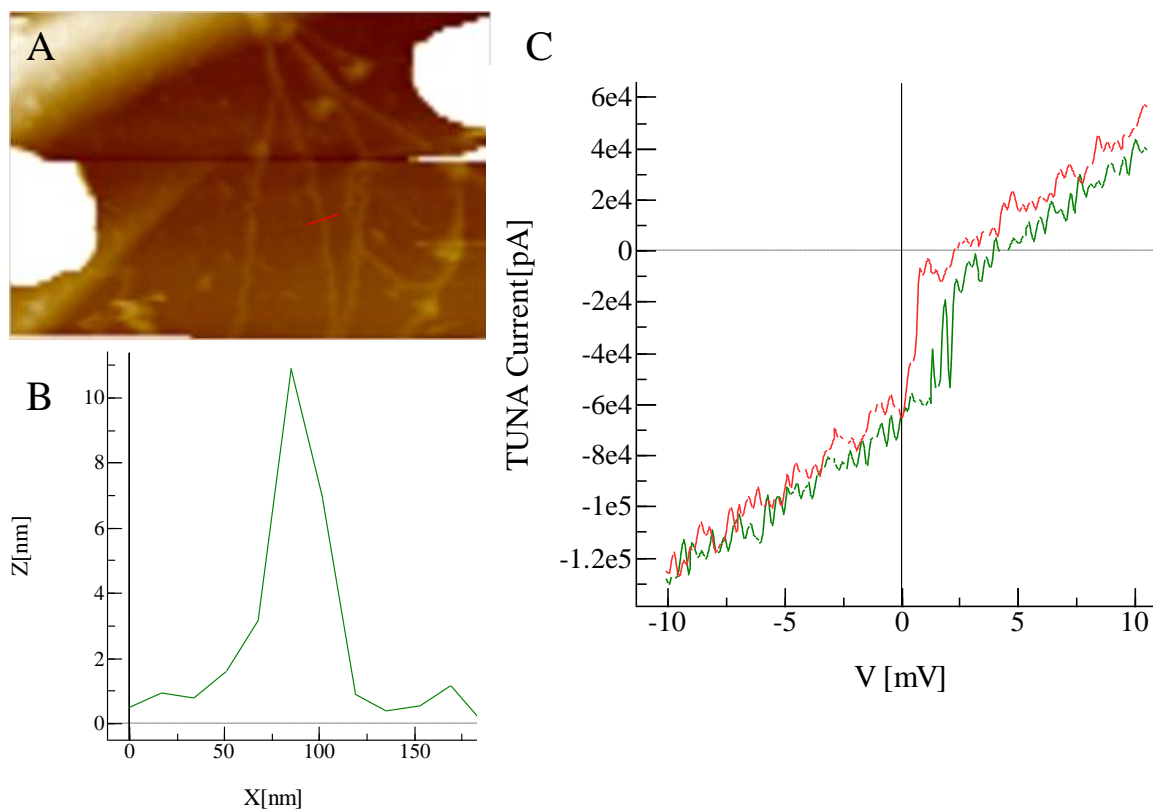


Figura 98. (A) Imagen de AFM en modo de contacto intermitente (*peak force tapping mode*) del cultivo de *A. hydrophila* con una alta densidad de nanohilos bacterianos. Las células y los nanohilos se encuentran sobre la superficie de HOPG. (B) Perfil de la sección transversal de un nanohilo bacteriano. (C) Gráfico I/V obtenido con la punta de AFM situada sobre los nanohilos.

Tras la observación topográfica de la muestra, se estudió la conductividad de los filamentos. La respuesta de corriente se midió mediante un barrido de potencial a través del nanohilo entre el soporte de HOPG y la punta (El-Naggar et al., 2008). El barrido de voltaje realizado fue entre -10 y 10 mV (figura 98C). La curva I/V exhibió un comportamiento conductor no lineal frente a la aplicación de una diferencia de potencial y se observaron varias irregularidades que probablemente se debieron a pequeñas fluctuaciones en la conductividad. Estas fluctuaciones podrían aportar información sobre la densidad de estados moleculares de la muestra. Sin embargo, la falta de un contacto fuerte entre la muestra y la punta podría interferir con la información obtenida de las curvas I/V. Las medidas de la conductividad mostraron picos que indicarían los niveles de energía discretos con un incremento de la densidad de estados. Como el grafito no mostró estos picos, esta propiedad se le atribuiría a los nanohilos.

El mecanismo de intercambio electrónico extracelular a través de filamentos conductores es controvertido. Hay tres formas principales de movimiento de electrones en los materiales: *tunnelling* (efecto túnel), *hopping* (saltos) y deslocalización (Petty, 2007) (Figura 99). En el transporte mediante *tunnelling* y *hopping*, los electrones están asociados a transportadores electrónicos discretos y pueden atravesar distintas posiciones para migrar a larga distancia (Figura 99a).

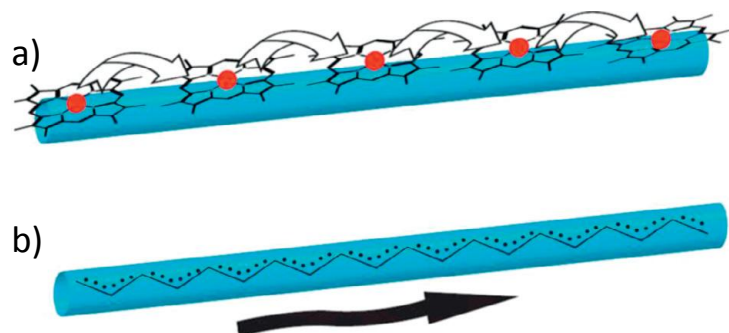


Figura 99. Esquema de los modelos de flujo de electrones a lo largo de los nanohilos microbianos. (a) Modelo de saltos de electrones (*hopping*) y (b) conductividad metálica (deslocalización de electrones).

Las evidencias obtenidas sugieren que los pilis producidos por *A. hydrophila* tienen conductividad metálica. La conductividad metálica es sustancialmente diferente a los dos mecanismos de *tunneling* y *hopping* mencionados anteriormente. Los electrones, en

lugar de encontrarse en moléculas aisladas, están deslocalizados a lo largo de una cadena de moléculas y tienen libertad para moverse a lo largo del material (Edwards et al., 2008), como se puede observar en la figura 99b. En este caso, la conductividad podría deberse a la superposición de orbitales π - π de los aminoácidos aromáticos.

Producción de nanohilos regulada mediante *quorum sensing* (QS)

Como se ha puesto ya de manifiesto, las biopelículas juegan un papel fundamental en los procesos biológicos, tanto en los medios naturales como en el campo tecnológico. Además, el desarrollo de biopelículas es un proceso complejo que puede regularse a distintos niveles mediante diferentes mecanismos. El mecanismo de *quorum sensing* es un fenómeno muy extendido que permite a los microorganismos establecer comunicaciones célula-célula y regular la expresión de genes específicos como respuesta a cambios locales en la densidad celular (Waters and Bassler, 2005). En muchas bacterias Gram negativas, la molécula señal de QS capaz de difundir pertenece a la familia de las *N*-acil-homoserina lactona (AHL) (Boyer and Wisniewski-Dyé, 2009; Winson et al., 1995).

A. hydrophila tiene un sistema de QS tipo I. Esta especie posee genes homólogos a los *luxI/R* de *Vibrio cholera* (denominados *ahyI/R*, respectivamente) y produce como autoinductores AHLs. Las principales lactonas identificadas son de cadena corta, *N*-butanoil-L-AHL (C4-AHL) y *N*-hexanoil-L-AHL (C6-AHL) (Swift et al., 1997). Varios fenotipos se regulan mediante QS en distintas cepas de *A. hydrophila*. Por ejemplo, una cepa mutante *ahyI*, incapaz de producir AHLs, no tenía actividad exoproteasa y no formaba biopelículas maduras en las superficies de acero. Mediante la adición externa de C4-AHL se revirtieron parcialmente estos fenotipos (Lynch et al., 2002; Swift et al., 1999).

Con el objetivo de estudiar la capacidad de producción de los autoinductores *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs) del aislado de *A. hydrophila*, los cuales podrían regular la producción de nanohilos, se realizó una extracción de AHLs del sobrenadante del cultivo con diclorometano. La espectroscopía de masas se utilizó para identificar la

presencia y la naturaleza de la molécula señal. Los estudios anteriores mediante espectroscopía de masas describen que el ion $[M+H]^+$, derivado de las AHLs y activado por colisión, se descompone en otros iones específicos entre los que se encuentran principalmente un ion correspondiente a la amino-butirolactona a m/z 102 y un ion derivado de la cadena acilo $[M+H-101]^+$ (Gould et al., 2006), siguiendo el esquema que se muestra en la figura 100.

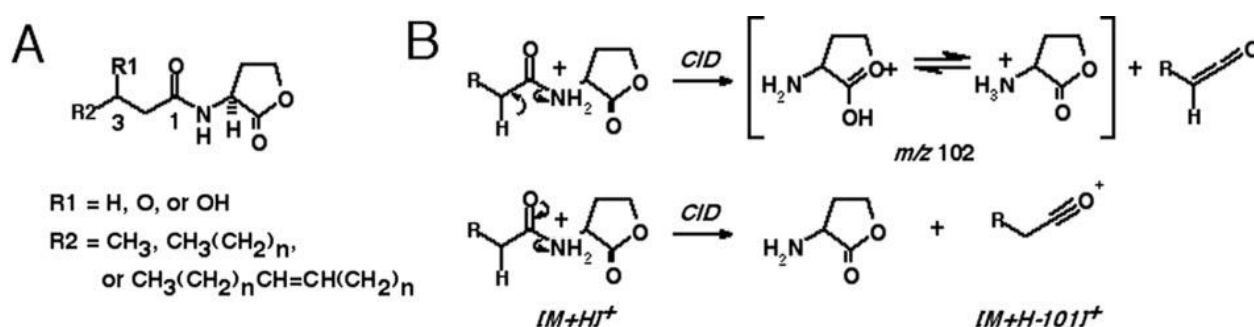


Figura 100. *N*-acil-homoserina lactonas. (A) Las AHLs producidas por bacterias Gram negativas varían por la sustitución en la posición C3 (R1) y por la longitud y la insaturación de la cadena acilo (R2). (B) Esquema propuesto para la descomposición de las AHLs inducida mediante colisión en los dos fragmentos iónicos principales (Gould et al., 2006).

El análisis por espectroscopía de masas del extracto del aislado (figura 101) presentó un pico a m/z 102 del fragmento iónico del anillo de la lactona y el ion $[M+H-101]^+$ a m/z 173 correspondería a la cadena lateral, lo cual es consistente con la estructura molecular de *N*-butanoil-L-AHL (C4-AHL), que ya se había detectado en otras cepas de *A. hydrophila*.

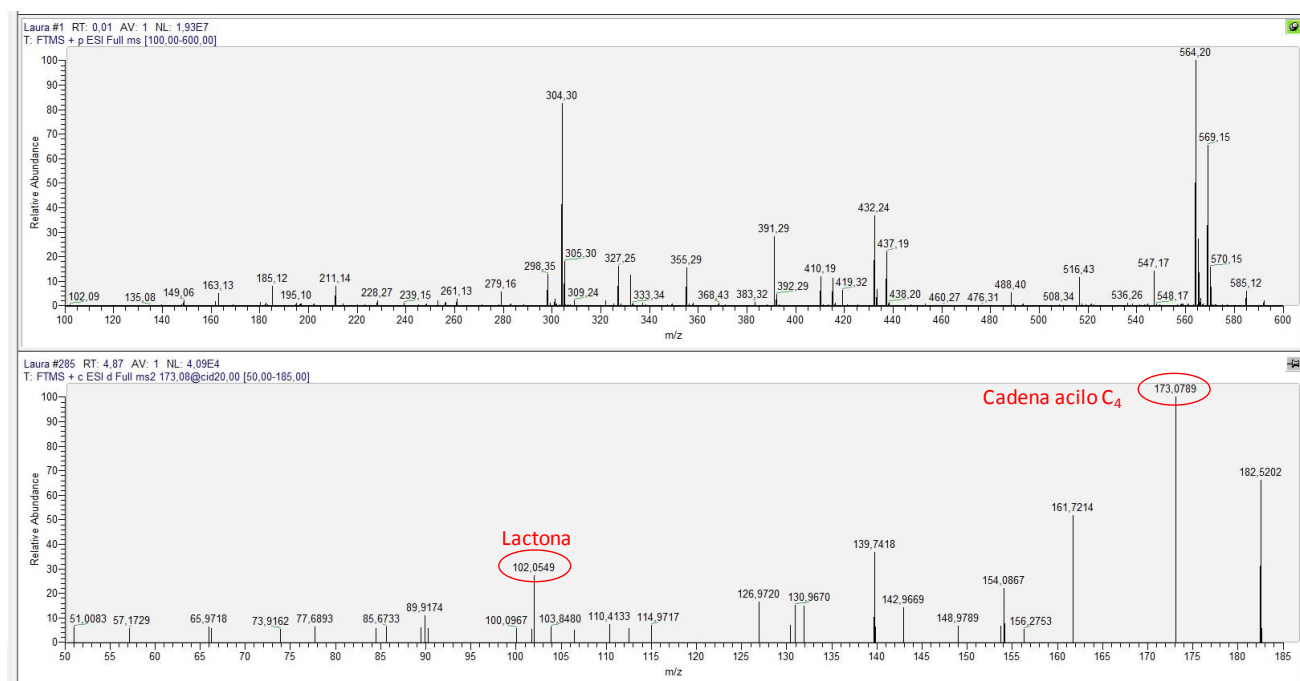


Figura 101. Análisis MS de los compuestos activos del extracto de un cultivo de *A. hydrophila*.

Con la intención de controlar la formación de estos nanohilos mediante QS, se estudió la adhesión de las células de *A. hydrophila* en presencia de las moléculas oxo-AHLs (C8, C12 y C14) añadidas externamente.

La superficie de las muestras de los cultivos con AHL añadidas y del cultivo control sin AHL externas se observaron mediante SEM después de 1, 4 y 8 horas de incubación. Se pusieron de manifiesto diferencias sustanciales entre los distintos ensayos, especialmente en las fases iniciales del desarrollo de la biopelícula (Figura 102).

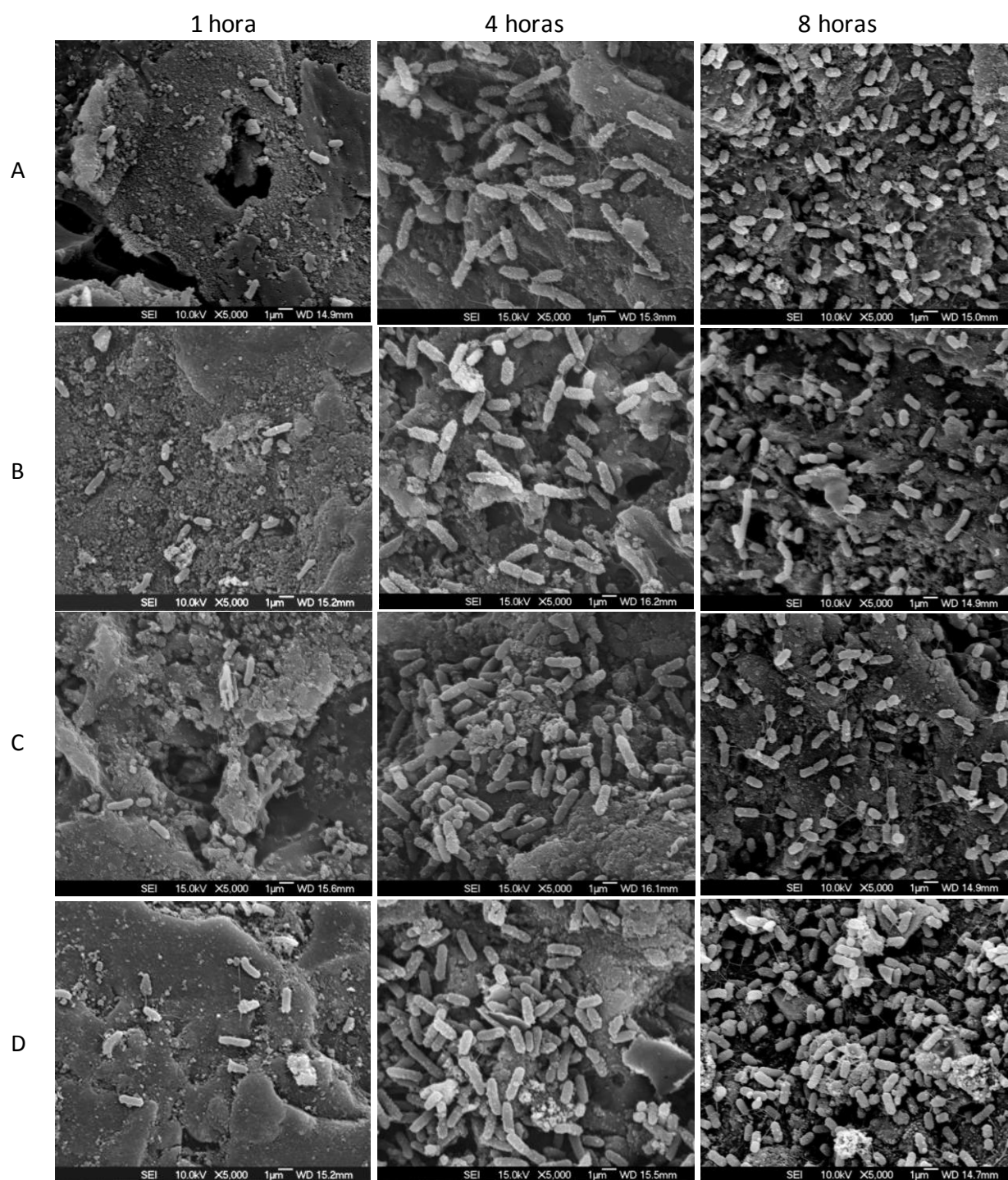


Figura 102. Efecto de la adición de AHLs en la formación de la biopelícula de *A. hydrophila*. Imágenes de SEM de la adhesión celular y de la formación de la biopelícula sobre carbón activado tras 1, 4 y 8 h de incubación. Fila A: cultivo control sin adición de AHL. Filas B-D: cultivos con 3-oxo-C8-AHL (B), 3-oxo-C12-AHL (C), y 3-oxo-C14-AHL (D).

Con la adición de 3-oxo-C8-AHL no se observaron cambios evidentes en comparación con el experimento control. En presencia de 3-oxo-C12-AHL, disminuyó la capacidad de los microorganismos para formar la biopelícula y, aunque se observaron células sobre la superficie del soporte, éstas no produjeron hilos. Es sabido que 3-oxo-C12-AHL y su derivado, el ácido tetrámico, presentan actividad bactericida y podrían alterar la expresión de distintos genes (Schertzer et al., 2009). Sin embargo, cuando se añadió la molécula 3-oxo-C14-AHL, tuvo lugar un gran incremento de la adhesión celular, así como de la formación de nanohilos en comparación con el control y con los cultivos tratados con 3-oxo-C8- y con 3-oxo-C12-AHL. Después de 24 horas de incubación, las bacterias presentaron como fenotipo una agregación celular en múltiples capas con nanohilos que interconectaban las células, como se muestra en la figura 103.

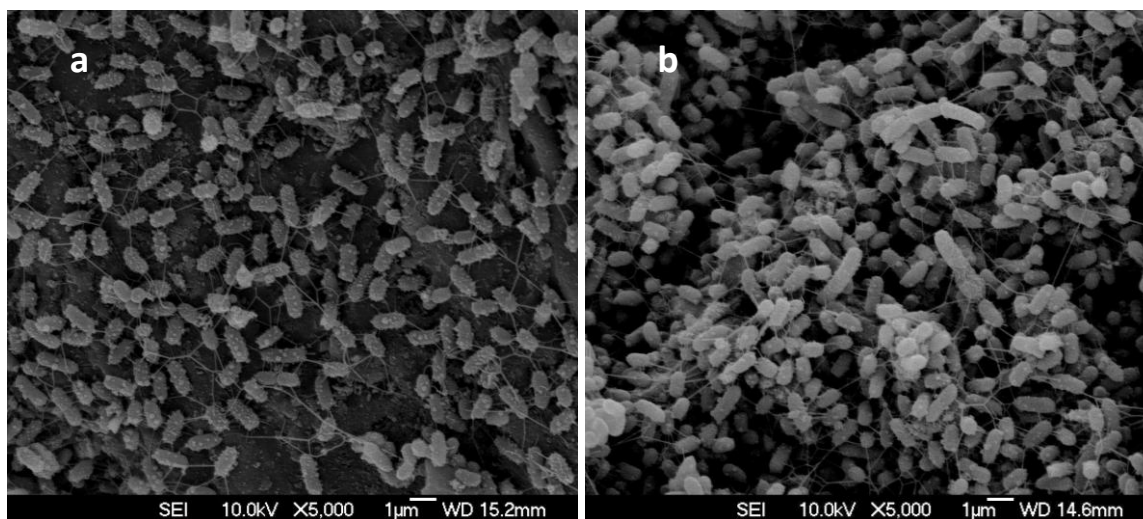


Figura 103. Imágenes de SEM de la biopelícula formada por *A. hydrophila* sobre carbón activado tras 24 h de incubación: (a) cultivo sin tratamiento y (b) cultivo con 3-oxo-C14-AHL.

Algunas especies de *Aeromonas* como *A. hydrophila* y *A. salmonicida* tienen un sistema de regulación mediante QS y producen AHLs de cadena corta (Garde et al., 2010; Swift et al., 1997). Estos resultados indican que determinadas moléculas de AHLs de cadena larga, secretadas por otras especies de bacterias, son reconocidas sugiriendo la posibilidad de que se establezca una comunicación cruzada entre las diferentes especies de las comunidades microbianas, como la que se ha descrito en biopelículas mixtas de otras bacterias Gram negativas (Riedel et al., 2001).

Debido a que la adherencia a la superficie del ánodo y la subsecuente formación de estas biopelículas conductoras pueden aumentar la producción de corriente eléctrica en pilas bacterianas de combustible, estos resultados podrían contribuir al desarrollo de nuevos métodos para diseñarlas o mejorarlas. Asimismo, el incremento del área superficial del ánodo repercutiría en un mayor número de células y un mayor desarrollo de la biopelícula y, todo ello, contribuiría a aumentar el flujo de electrones a la superficie.

Conclusiones de la Parte 3. Part 3 Conclusions

Las principales conclusiones relativas al mecanismo de reducción microbiológica de sólidos férricos obtenidas en este estudio se detallan a continuación:

- 1) Las sustancias húmicas son la forma de materia orgánica más abundante en muchos ambientes sedimentarios y pueden ser fundamentales para la biorreducción microbiana de Fe(III) al actuar como lanzaderas de electrones. El consorcio natural y la cepa de *S. putrefaciens* fueron capaces de utilizar AQDS (molécula análoga a las sustancias húmicas) como lanzadera de electrones y de esta manera aceleraron el proceso de biorreducción de las jarositas. *S. putrefaciens* alcanzó el máximo porcentaje de reducción con una velocidad dos veces superior en presencia de AQDS que sin esta molécula lanzadera de electrones. Sin embargo, *A. hydrophila* no fue capaz de utilizar la molécula de AQDS como intermediario electrónico entre las células y la jarosita.
- 2) Los agentes quelantes favorecieron la reducción y solubilización de los minerales férricos que se suministraron como única fuente de hierro, al estar el hierro más biodisponible.
- 3) *A. hydrophila* redujo y solubilizó aproximadamente el 90% del hierro suministrado en forma de jarositas en presencia tanto de citrato de sodio como de EDTA.
- 4) *S. putrefaciens* aceleró el proceso de biorreducción de la jarosita en presencia de citrato y no de EDTA, sugiriendo que el número de sitios disponibles que deja el

complejo para que la bacteria pueda acceder al hierro así como la capacidad del microorganismo para disociar el complejo son cruciales.

- 5) Las biopelículas desempeñan un papel clave en la interacción bacteria/mineral. El consorcio microbiano y *A. hydrophila* desarrollaron biopelículas sobre los sólidos. Sin embargo, *S. putrefaciens* generó una biopelícula poco densa sobre las superficies, probablemente debido a la capacidad de esta especie para secretar intermediarios que posibilitan el intercambio electrónico con los minerales férricos sin necesidad de establecer un contacto directo célula/mineral.
- 6) Las biopelículas contienen las sustancias poliméricas que permiten la interacción célula/ mineral. Los componentes fundamentales de las EPS generadas por las bacterias capaces de reducir metales fueron las proteínas. Éstas favorecen tanto la adhesión a las superficies sólidas como la transferencia de electrones. Los polisacáridos intervienen fundamentalmente en el mantenimiento de la estructura de las biopelículas, posibilitando, además, la interacción entre los microorganismos.
- 7) *A. hydrophila* fue capaz de generar nanohilos que facilitan la comunicación entre bacterias con otras y la adhesión de las células a las superficies. Los nanohilos presentan propiedades conductoras de la electricidad de forma que las bacterias quedan conectadas “eléctricamente”.
- 8) Los soportes con densidad de carga superficial positiva y/o conductores favorecen la adhesión celular y la formación de nanohilos.
- 9) Los pilis de *A. hydrophila* son de naturaleza proteica, probablemente secreciones tipo IV.
- 10) *A. hydrophila* A posee un sistema de *quorum sensing* que permite regular la formación de nanohilos conductores con diferentes AHLs. La molécula 3-oxo-C14-AHL favoreció la formación de nanohilos mientras que la 3-oxo-C12-AHL inhibió inicialmente su expresión.

The main conclusions referred to the microbial reduction mechanisms of ferric minerals were as follows:

- 1) Humic substances are the most abundant form of organic matter in sedimentary environments and can be fundamental in microbial Fe(III)-reduction acting as electron shuttling molecules. The natural consortium and *S. putrefaciens* strain can use molecules similar to humic substances as electron shuttles to stimulate Fe(III) reduction. *S. putrefaciens* reached the maximum percentage of reduction faster in the presence of AQDS than in its absence. However, *A. hydrophila* cannot use this molecule as electron shuttling between cells and jarosites.
- 2) The chelating compounds stimulated the reduction and solubilization of the ferric minerals supplied as the sole ferric source because the iron is more bioavailable.
- 3) *A. hydrophila* reduced and dissolved approximately 90% of the iron supplied as jarosites in the presence of citrate and EDTA.
- 4) *S. putrefaciens* increased the reduction rate of jarosite only in the presence of citrate, suggesting that the access of bacteria to the iron in the complex formed and the ability of microorganisms to promote the dissociation of the complex are critical aspects of the process.
- 5) Biofilms play a key role in the interaction between microorganisms and minerals. The microbial consortium and *A. hydrophila* strain promoted the formation of biofilms on solid surfaces. Unlike those bacterial cultures, *S. putrefaciens* showed scanty biofilm formation. Biofilms were characterized by chemical analysis and several surface techniques (FTIR, SEM, CLSM).
- 6) The biofilms contain polymeric substances involved in the cell-mineral interaction. The main components of the EPS generated by metal reducing microorganisms were proteins. Extracellular proteins mediated both surface attachment on the solids and electron transfer. Polysaccharides were mainly involved in the maintenance of the biofilm structure and interaction between microorganisms.

- 7) *A. hydrophila* developed pilus-like appendages of nanometer size that bacteria use to attach to solid surfaces and also for connecting cells to each other. These nanowires were electrically conductive.
- 8) The positive surface charged and/or conductive supports enhance the cell adhesion and the nanowires formation.
- 9) Nanowires were mainly composed of proteins, probably Type IV secretion system.
- 10) *A. hydrophila* A has a quorum sensing system which allowed it to regulate the expression of the nanowires formation. The molecule 3-oxo-C14-AHL enhanced the nanowires formation, while 3-oxo-C14-AHL inhibited their expression in early stages.

5. CONCLUSIONES GENERALES

La biorreducción de Fe(III) descrita en este documento sugiere potenciales aplicaciones en diferentes campos de la biotecnología. Aunque el estudio se centró en la biolixiviación de minerales férricos para la recuperación del metal, determinadas características de los cultivos hacen que sean de interés en otros campos como la biorremediación o la producción de electricidad.

Biolixiviación. Como es bien conocido, esta es una de las aplicaciones del uso de los microorganismos en biohidrometalurgia con el fin de extraer metales de diferentes minerales. La biolixiviación de minerales de hierro depende de múltiples factores entre los que destacan el tipo de microorganismo utilizado, las características del mineral tratado y la materia orgánica presente en el medio.

Los rendimientos de lixiviación de minerales alcanzados mediante el uso de microorganismos resultan bajos en comparación con las técnicas hidrometalúrgicas tradicionales. Sin embargo, aunque se trate de un proceso lento en comparación con la pirometalurgia y la hidrometalurgia, es menos costoso, más eficaz, más fácil de controlar y afecta en menor medida al medio ambiente.

Se obtuvo un consorcio microbiano procedente de una mina abandonada cerca de La Unión, en la provincia de Murcia. El uso de estos cultivos mixtos en los procesos de biolixiviación autotrófica puede resultar beneficioso; sin embargo, cuando el proceso se lleva a cabo con microorganismos heterótrofos, la competencia por la fuente de carbono añadida puede afectar de manera adversa al degradarse las moléculas que mantienen el hierro en disolución. Las cepas puras presentaron mejores características para su aplicación biotecnológica en la lixiviación reductora de los minerales de Fe(III).

El interés económico actual de la biolixiviación de hierro es bajo, por este motivo la lixiviación microbiana de hierro se podría utilizar con el fin de recuperar metales valiosos o para eliminar hierro en procesos en los que resulta perjudicial. En este estudio, el objetivo principal fue la biolixiviación de jarositas, cuya biorreducción microbiana ha sido poco estudiada, pudiendo, además, contener metales como el plomo y la plata, sobre todo ésta, con un indiscutible interés económico.

Posteriores modificaciones, tales como la adición de AQDS como lanzadera de electrones o de agentes quelantes de hierro como el citrato sódico o el EDTA,

favorecieron el proceso de biorreducción. El uso de agentes quelantes permitió que se alcanzasen valores máximos de lixiviación de jarosita próximos al 90% utilizando *A. hydrophila*, un porcentaje muy interesante para la aplicación de la biolixiviación anaerobia.

Biorremediación. Este bioproceso utiliza el metabolismo de distintos organismos para devolver a su condición natural un medio ambiente alterado por, cada vez, más contaminantes. Los drenajes ácidos de mina son aguas ácidas contaminadas que se generan en minas generalmente abandonadas. Se ha probado la adición de cepas microbianas para mejorar la eficacia de las poblaciones autóctonas en el proceso de descontaminación.

La mayoría de los metales en disolución ácida precipitan en contacto con el ion sulfuro, por ejemplo, procedente del H_2S . La separación de los precipitados generados tras la reacción daría lugar a un efluente sin metales que puede ser eliminado y tratado, y a un concentrado de sulfuros metálicos con un posible valor económico.

Se ha estudiado la precipitación de metales utilizando sulfuros biogénicos como un proceso de biorremediación. Por ello, el consorcio microbiano natural, que contiene bacterias sulfato-reductoras, podría utilizarse para este propósito. La utilización de microorganismos procedentes de un ambiente minero redundaría en una adaptación al medio más fácil y en un posible impacto menor en el ecosistema que rodea la zona donde se realiza la aplicación biotecnológica. En el proceso de biorremediación utilizando bacterias sulfato-reductoras, éstas oxidan materia orgánica reduciendo sulfatos. Entre los productos metabólicos se encuentra el ion bicarbonato, que puede neutralizar la acidez del agua, y el ácido sulfhídrico, que forma precipitados muy insolubles con muchos metales tóxicos.

Pilas de combustible. El concepto de utilizar microorganismos en pilas de combustible es una idea planteada desde hace relativamente bastante tiempo por la comunidad científica. *A. hydrophila* y otros microorganismos pueden metabolizar materia orgánica y, en condiciones de anaerobiosis, transferir los electrones generados al hierro y a otros minerales presentes en el medio.

En este trabajo, *A. hydrophila* se creció sobre superficies de grafito formando unos “nanohilos” conductores entre las células y la superficie sólida que conectaban las bacterias entre sí. Estos hilos podrían permitir la transferencia de los electrones generados en la respiración microbiana a los electrodos de grafito para producir electricidad.

Con el fin de mejorar la eficiencia y velocidad del sistema, otros investigadores han tratado de incrementar el área superficial de los electrodos para permitir el crecimiento de más bacterias. Desde este punto de vista, el control de la formación de nanohilos conductores mediante *quorum sensing* utilizando moléculas que favorezcan su desarrollo podría influir de manera positiva en la utilización de estas bacterias como una fuente de energía viable.

A continuación, se enumeran las principales conclusiones que se desprenden del presente trabajo de investigación:

- 1) A partir de un muestro en un área minera abandonada del sureste de España, se consiguió aislar un consorcio microbiano con capacidad reductora de Fe(III). Los análisis moleculares del consorcio revelaron que el género más abundante fue *Clostridium*, especie que suele dominar muchos ambientes debido a que es flexible en el uso de diferentes aceptores de electrones. Se aislaron e identificaron varias especies (*C. celerecrescens*, *C. amygdalinum*, *A. hydrophila*, *S. fonticola*). La especie *Aeromonas hydrophila* presentó características interesantes desde el punto de vista biotecnológico, ya que mantuvo el Fe(II) en disolución por lo que podría aplicarse en la biolixiviación de minerales y en la recuperación de otros metales valiosos. La cepa de colección *S. putrefaciens* también fue objeto de estudio por presentar el mismo comportamiento. El consorcio natural precipitó el hierro reducido como siderita.
- 2) Para estudiar el proceso de biorreducción de minerales férricos se escogieron jarositas con diferente composición química: jarositas de amonio y de potasio, argentojarosita y mineral de gossan procedente de Río Tinto (España), un mineral natural que tiene, asimismo, jarositas en su composición.

- 3) El consorcio microbiano natural se adaptó progresivamente a su cultivo utilizando minerales con alto contenido en metales pesados. Probablemente, un factor decisivo fue su capacidad sulfato-reductora ya que los sulfuros generados precipitarían los cationes metálicos presentes en el medio reduciendo su toxicidad. Este hecho, junto con su capacidad para crecer a pH moderadamente ácidos, lo convierte en un cultivo de interés en procesos de biorremediación de ambientes mineros.
- 4) Las cepas puras de *S. putrefaciens* y *A. hydrophila* fueron capaces de mantener en fase acuosa el ion ferroso generado en su metabolismo. La composición de los minerales férricos fue de gran importancia para la reducción microbiana. La presencia de metales tóxicos disminuyó la eficiencia de la biorreducción. No obstante, los minerales con mayor cantidad de estos elementos tóxicos y de mayor económico se concentraron al disolverse una parte del hierro suministrado inicialmente. *S. putrefaciens* generó nanopartículas de plata al crecer con argentojarosita.
- 5) La biolixiviación de jarositas con *A. hydrophila* se favoreció al llevarse a cabo en semi-continuo al evitar la precipitación de compuestos de Fe(II) sobre los minerales férricos y/o sobre las células.
- 6) La influencia de las sustancias húmicas en la biorreducción de jarositas evidenció que *S. putrefaciens* y el consorcio natural fueron capaces de utilizar estas moléculas como lanzaderas de electrones. *S. putrefaciens* fue capaz de alcanzar el máximo de reducción del hierro del 80% en la mitad de tiempo por la presencia de AQDS que aceleró la cinética del proceso.
- 7) Los agentes quelantes tuvieron gran influencia en la biorreducción de jarosita mediante los cultivos puros estudiados en el trabajo ya que aliviaron la necesidad de establecer un contacto directo con los sólidos o de secretar sideróforos o moléculas que actuaran como lanzadera de electrones. Las cepas de *A. hydrophila* y *S. putrefaciens* fueron capaces de reducir y solubilizar altos porcentajes de hierro en un tiempo de aproximadamente una semana. Esto favorece su aplicación en biolixiviación. No obstante, el número de sitios libres

que deja el complejo para que las células puedan acceder al hierro y la capacidad de disociar el complejo de hierro son cruciales en el proceso de reducción.

- 8) Las biopelículas y las sustancias poliméricas extracelulares juegan un papel fundamental en la biorreducción de hierro, especialmente sobre minerales. Las proteínas son clave, no sólo en la adhesión sino también en la transferencia de electrones, y son el principal componente de las EPS tanto en los cultivos de *A. hydrophila* como los de *S. putrefaciens*. Los polisacáridos son fundamentales para la adhesión a las superficies y la adhesión intercelular, y para mantener la estructura de la biopelícula. Además, en cultivos mixtos, los exopolisacáridos facilitarían la integración de las distintas especies en la matriz polimérica.
- 9) *A. hydrophila* produce nanohilos conductores. Además de servir como conductos para la transferencia de electrones a los óxidos férricos, estos filamentos podrían estar involucrados en otras reacciones de intercambio. Los nanohilos conductores son de naturaleza proteica, probablemente T4SSs. La adición de algunos autoinductores de *quorum sensing*, como las *N*-acil-homoserina-lactonas, incrementan o inhiben la formación de estos hilos. El estudio de los sistemas de transferencia electrónica de las bacterias reductoras de metales puede llevar a nuevos avances en aplicaciones como la nanoelectrónica o la producción de energías renovables en celdas de combustible microbianas.

Fe(III) bio-reduction studied in the present work points out potential applications in different fields of biotechnology. Although this study was focused on the bioleaching of ferric minerals to recover the metal, the characteristics of the different cultures suggest their implementation in other areas such as bioremediation or in electricity production.

Bioleaching. This is one of several applications within biohydrometallurgy to extract metals from their ores through the use of living organisms. Iron mineral bioleaching depends on several factors, including the type of microorganism, the characteristic of the treated mineral and the organic matter present in the environment.

The yields of mineral leaching reached by using microorganisms are low in comparison to the traditional hydrometallurgical techniques. Even if the bioleaching is a slow process compared to pyrometallurgy and hydrometallurgy, it is a low cost, efficient, easy-handling and environmentally friendly method.

A microbial consortium was obtained from an abandoned mine near La Unión. The use of mixed cultures in autotrophic bioleaching processes could be profitable; however, when the process is developed using heterotrophic microorganisms, the competence for the carbon sources could result in adverse consequences if the Fe(III)-chelating compounds are also oxidized. The pure strains exhibit better characteristics for bioleaching.

The economic value of ferric minerals is generally low; thus, the recovery of valuable metals or the removal of iron in processes where this metal has a detrimental impact justify the anaerobic bioleaching. The aim of this work was to investigate the bioleaching of jarosites because their microbial bio-reduction has been poorly studied and jarosites can contain valuable metals such as lead and silver.

Subsequent modifications, such as the addition of AQDS as electron shuttling molecule or the addition of citrate and EDTA as Fe(III)-chelating agents, enhanced the bio-reduction and bioleaching processes. The use of chelating compounds promoted the bioleaching of jarosite achieving 90% of the iron in solution using *A. hydrophila*, a very interesting percentage for biotechnological application.

Bioremediation. This bioprocess is based on the use of metabolic pathways of different organisms to remove pollutants. Acid mine drainage refers to the outflow of acidic water from (usually abandoned) metal mines or coal mines. Recent advancements have also proven successful via the addition of matched microbe strains to the medium to enhance the resident microbe population's ability to break down contaminants.

Most base metals in acidic solution precipitate in contact with free sulphide, e.g. from H_2S . Solid-liquid separation after reaction would produce a base metal-free effluent that can be discharged or further treated to reduce sulphate, and a metal sulphide concentrate with possible economic value.

As an alternative, several researchers have investigated the precipitation of metals using biogenic sulphide. In consequence, the natural consortium which contain sulphate-reducing could be suitable for this purpose. The use of microorganisms from a mine environment would end up benefiting the easier adaptation to the area and the lower impact in the surrounding area where the biotechnological application is applied. In this process, these bacteria oxidize organic matter using sulphate. Their metabolic products include bicarbonate, which can neutralize water acidity, and hydrogen sulphide, which forms highly insoluble precipitates with many toxic metals.

Fuel cells. The concept of using microbes to power fuel cells has been around the researchers for a while. *A. hydrophila* and other microorganisms can metabolize organic matter and, in anaerobic conditions, transfer the generated electrons to iron and other minerals in the surrounding environment.

In the present work, *A. hydrophila* grew on graphite supports developing conductive “nanowires” between the cells and the surface and interconnecting bacteria. The flow of electrons from the bacteria to the electrode generated electricity that could be stored. These wires could allow the flow of electrons from the bacteria to an electrode to generate electricity.

In order to improve the efficiency and speed of the system, some researchers are trying to increase the surface area of the electrodes to allow more bacteria to grow. From this point of view, the control of conductive nanowires formation through quorum sensing

using signaling molecules which promote their development could have a positive influence in the use of these microbes as a viable energy source.

Listed below are summarized the main findings of the present research work:

- 1) An iron-reducing microbial consortium was obtained sampling in an abandoned mine in the southeast of Spain. Molecular analysis (DGGE) of the bacterial prokaryotic consortium revealed the genus *Clostridium* was the most abundant. Four species were isolated and identified (*C. celerecrescens*, *C. amygdalinum*, *A. hydrophila*, *S. fonticola*). From the biotechnological point of view, the isolate *A. hydrophila* possess interesting characteristics. This isolate keeps the Fe(II) in the aqueous phase and could be implemented in the bioleaching of minerals and the recovering of metals. A type strain, *S. putrefaciens*, was also studied because it presents the same behavior.
- 2) Jarosites with different composition were selected to in the study of ferric minerals bio-reduction: a mixture of potassium and ammonium jarosites, argentojarosite and gossan mineral from Rio Tinto (Spain), a natural mineral which contains jarosites.
- 3) The natural microbial consortium was progressively adapted to grow using minerals with a high content in heavy metals. Probably, a key factor would be the presence of sulphate-reducing bacteria in the culture which could promote sulphide precipitation of metallic cations in the microcosmos with toxic effect. This fact joined to the ability of the culture to grow at moderate acidic pH indicates the suitability of this natural consortium for biorremediation in mine areas.
- 4) The pure cultures of *S. putrefaciens* and *A. hydrophila* were able to keep in the aqueous phase the ferrous ion generated in their metabolism. The composition of the jarosites was very important in the microbial reduction. The presence of toxic metals decreased the efficiency of the reduction. However, the mineral with higher concentration of these valuable and toxic metals were upgraded.

- S. putrefaciens* biosynthesized silver nanoparticles when it grew with argentojarosite.
- 5) Bioleaching of jarosites by *A. hydrophila* was enhanced in semi-continuous tests, avoiding the precipitation of Fe(II)-compounds on the ferric minerals and/or on the cells.
 - 6) The influence of the humic substances in the bio-reduction of jarosite was studied. The natural consortium and *S. putrefaciens* used these molecules as electron shuttling compounds. *S. putrefaciens* reached the maximum percentage of reduction, 80% of the iron provided in the presence of AQDS in half the time of those without it. This molecule enhanced the kinetics of the process.
 - 7) The Fe(III)-chelating compounds influenced the bio-reduction of the jarosite by the pure strains. They alleviated the necessity of the direct contact cell/mineral or the release of siderophores or extracellular electron shuttling compounds. *A. hydrophila* and *S. putrefaciens* reduced and solubilized high percentages of iron after approximately one week of microbial reaction. These were promising results related to the implementation of the ore dissolution process. Nevertheless, the number of coordination sites of the iron occluded by the chelant agent and the ability to complete dissociation of the aqueous Fe(III)-organic complex are fundamental for enzymatic reduction.
 - 8) The biofilms and the extracellular polymeric substances play a key role in the Fe(III) bio-reduction, specially on minerals. The proteins are crucial not only in the adhesion but also in the electron transfer, and they were the main component of the EPS produced by *A. hydrophila* and *S. putrefaciens*. Polysaccharides are fundamental in the cell attachment to the solid surfaces, the aggregation of cells and the maintenance of the biofilm structure. Moreover, exopolysaccharides in mixed cultures may lead to the integration of other species in the biofilm matrix.
 - 9) *A. hydrophila* produced conductive nanowires. Bacterial pili may act as electron conduits to metal acceptors during respiration, and it is possible that they also play a role in interbacterial signaling. These conductive nanowires are composed by proteins, they are probably T4SSs. Furthermore, the addition of some quorum sensing autoinducers such as *N*-acyl-homoserine lactones enhanced or inhibited

the formation of these wires. The research on electronic transfer systems of metal reducing bacteria can lead to new approaches in nanoelectronics or in renewable energy development using bacterial fuel cells.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M.E., Postgate, J.R., A New Sulphate-Reducing Vibrio. *J Gen Microbiol*, 1959, **20(2)**, 252-257.

Alasonati, E., Slaveykova, V.I., Effects of extraction methods on the composition and molar mass distributions of exopolymeric substances of the bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Bioresource Technol*, 2012, **114(0)**, 603-609.

Anthony, K.G., Sherburne, C., Sherburne, R., Frost, L.S., The role of the pilus in recipient cell recognition during bacterial conjugation mediated by F-like plasmids. *Mol Microbiol*, 1994, **13(6)**, 939-953.

Arahal, D., Sanchez, E., Macian, M., Garay, E., Value of recN sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family "Leuconostocaceae". *Int Microbiol*, 2008, **11(1)**, 33-39.

Arnold, R.G., Hoffmann, M.R., Dichristina, T.J., Picardal, F.W., Regulation of Dissimilatory Fe(III) reduction activity in *Shewanella putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56(9)**, 2811-2817.

Balashova, V.V., Zavarzin, G.A., Anaerobic reduction of ferric iron by hydrogen bacteria. *Mikrobiologiya*, 1979, **48(5)**, 773-778.

Balasubramanian, S., Kannan, T.R., Baseman, J.B., The surface-exposed carboxyl region of mycoplasma pneumoniae elongation Factor Tu interacts with fibronectin. *Infect Immun*, 2008, **76(7)**, 3116-3123.

Balasubramanian, S., Kannan, T.R., Hart, P.J., Baseman, J.B., Amino acid changes in Elongation Factor Tu of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* influence fibronectin binding. *Infect Immun*, 2009, **77(9)**, 3533-3541.

Barrie Johnson, D., Hallberg, K.B., 2008. Carbon, Iron and sulfur metabolism in acidophilic micro-organisms, In *Advances in Microbial Physiology*, ed. Robert, K.P. Academic Press, pp. 201-255.

Beliaev, A.S., Saffarini, D.A., McLaughlin, J.L., Hunnicutt, D., MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Mol Microbiol*, 2001, **39(3)**, 722-730.

Bird, L.J., Bonnefoy, V., Newman, D.K., Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends Microbiol*, 2011, **19**(7), 330-340.

Blakeney, M.D., Moulaei, T., DiChristina, T.J., Fe(III) reduction activity and cytochrome content of *Shewanella putrefaciens* grown on ten compounds as sole terminal electron acceptor. *Microbiol Res*, 2000, **155**(2), 87-94.

Blodau, C., Knorr, K.-H., Experimental inflow of groundwater induces a “biogeochemical regime shift” in iron-rich and acidic sediments. *J Geophys Res Biogeosciences*, 2006, **111**(G2), G02026.

Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem*, 1973, **54**(2), 484-489.

Bonneville, S., Behrends, T., Van Cappellen, P., Solubility and dissimilatory reduction kinetics of iron(III) oxyhydroxides: A linear free energy relationship. *Geochim Cosmochim Ac*, 2009, **73**(18), 5273-5282.

Bonneville, S., Van Cappellen, P., Behrends, T., Microbial reduction of iron(III) oxyhydroxides: effects of mineral solubility and availability. *Chem Geol*, 2004, **212**(3-4), 255-268.

Bourven, I., Joussein, E., Guibaud, G., Characterisation of the mineral fraction in extracellular polymeric substances (EPS) from activated sludges extracted by eight different methods. *Bioresource Technol*, 2011, **102**(14), 7124-7130.

Boyer, M., Wisniewski-Dyé, F., Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009, **70**(1), 1-19.

Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**, 248-254.

Brandl, H., 2008. Microbial leaching of metals, In *Biotechnology*. Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 191-224.

Bridge, T.A.M., Johnson, D.B., Reduction of soluble iron and reductive dissolution of ferric iron-containing minerals by moderately thermophilic iron-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64(6)**, 2181-2186.

Bridge, T.A.M., Johnson, D.B., Reductive dissolution of ferric iron minerals by *Acidiphilium* SJH. *Geomicrobiol J*, 2000, **17(3)**, 193-206.

Brimer, C.D., Montie, T.C., Cloning and comparison of *fliC* Genes and Identification of glycosylation in the Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. *J Bacteriol*, 1998, **180(12)**, 3209-3217.

Brock, T.D., Gustafson, J., Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1976, **32(4)**, 567-571.

Brutinel, E., Gralnick, J., Shuttling happens: soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella*. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 2012, **93(1)**, 41-48.

Burton, K., A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J*, 1956, **62(2)**, 315-323.

Cao, B., Shi, L., Brown, R.N., Xiong, Y., Fredrickson, J.K., Romine, M.F., Marshall, M.J., Lipton, M.S., Beyenal, H., Extracellular polymeric substances from *Shewanella* sp. HRCR-1 biofilms: characterization by infrared spectroscopy and proteomics. *Environ Microbiol*, 2011, **13(4)**, 1018-1031.

Castro, A., Ehrlich, H.L., Reduction of iron oxide minerals by a marine *Bacillus*. *A van Leeuw*, 1970, **36(1)**, 317-327.

Castro, L., García-Balboa, C., González, F., Ballester, A., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A., Effectiveness of anaerobic iron bio-reduction of jarosite and the influence of humic substances. *Hydrometallurgy*, 2013, **131–132(0)**, 29-33.

Castro, S.L., Nelman-Gonzalez, M., Nickerson, C.A., Ott, C.M., Induction of attachment-independent biofilm formation and repression of *Hfq* expression by low-fluid-shear culture of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77(18)**, 6368-6378.

Cataldi, T.R., Bianco, G., Abate, S., Profiling of N-acyl-homoserine lactones by liquid chromatography coupled with electrospray ionization and a hybrid quadrupole linear ion-trap and Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-FTICR-MS). *J Mass Spectrom*, 2008, **43**(1), 82-96.

Coates, J.D., Ellis, D.J., Gaw, C.V., Lovley, D.R., *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49** (4), 1615-1622.

Coggon, M., Becerra, C.A., Nüsslein, K., Miller, K., Yuretich, R., Ergas, S.J., Bioavailability of jarosite for stimulating acid mine drainage attenuation. *Geochim Cosmochim Ac*, 2012, **78**(0), 65-76.

Colleran, E., Finnegan, S., Lens, P., Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *A van Leeuw*, 1995, **67**(1), 29-46.

Cummings, D.E., Caccavo Jr, F., Spring, S., Rosenzweig, R.F., *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. *Arch Microbiol*, 1999, **171**(3), 183-188.

Childers, S.E., Ciufo, S., Lovley, D.R., *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature*, 2002, **416**(6882), 767-769.

Chromy, B.A., Choi, M.W., Murphy, G.A., Gonzales, A.D., Corzett, C.H., Chang, B.C., Fitch, J.P., McCutchen-Maloney, S.L., Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *J Bacteriol*, 2005, **187**(23), 8172-8180.

Decho, A.W., Frey, R.L., Ferry, J.L., Chemical challenges to bacterial AHL signaling in the environment. *Chem Rev*, 2011, **111**(1), 86-99.

Demergasso, C.S., Galleguillos P, P.A., Escudero G, L.V., Zepeda A, V.J., Castillo, D., Casamayor, E.O., Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy*, 2005, **80**(4), 241-253.

Dobbin, P., Powell, A., McEwan, A., Richardson, D., The influence of chelating agents upon the dissimilatory reduction of Fe(III) by *Shewanella putrefaciens*. *Biometals*, 1995, **8**(2), 163-173.

Dopson, M., Baker-Austin, C., Hind, A., Bowman, J.P., Bond, P.L., Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70(4)**, 2079-2088.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 1956, **28(3)**, 350-356.

Dutrizac, J.E., Jambor, J.L., Jarosites and their application in hydrometallurgy. *Rev Miner*, 2000, **40(1)**, 405-452.

Edwards, P.P., Gray, H.B., Lodge, M.T.J., Williams, R.J.P., Electron transfer and electronic conduction through an intervening medium. *Angew Chem Int Edit*, 2008, **47(36)**, 6758-6765.

Ehrlich, H.L., Microbes for biohydrometallurgy. *Mineral Bioprocessing*, 1991, 27-41.

Eisele, T.C., Gabby, K.L., Review of reductive leaching of iron by anaerobic bacteria. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, 2014, **35(2)**, 75-105.

El-Naggar, M.Y., Gorby, Y.A., Xia, W., Nealson, K.H., The molecular density of states in bacterial nanowires. *Biophys J*, 2008, **95(1)**, L10-L12.

Elwood Madden, M.E., Bodnar, R.J., Rimstidt, J.D., Jarosite as an indicator of water-limited chemical weathering on Mars. *Nature*, 2004, **431(7010)**, 821-823.

Fanning, D.S., Rabenhorst, M.C., Bigham, J.M., Colors of acid sulfate soils. *Soil Color*, 1993, 91-108.

Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *J Bacteriol*, 2007, **189(22)**, 7945-7947.

Flemming, H.-C., Wingender, J., The biofilm matrix. *Nat Rev Micro*, 2010, **8(9)**, 623-633.

Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Kennedy, D.W., Dong, H., Onstott, T.C., Hinman, N.W., Li, S.-m., Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction

of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochim Cosmochim Acta*, 1998, **62**(19–20), 3239-3257.

Freitas, F., Alves, V.D., Torres, C.A.V., Cruz, M., Sousa, I., Melo, M.J., Ramos, A.M., Reis, M.A.M., Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139. *Carbohydr Polym*, 2011, **83**(1), 159-165.

Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 1994, **176**(2), 269-275.

Gadd, G.M., Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 2010, **156**(3), 609-643.

Gade, A., Ingle, A., Whiteley, C., Rai, M., Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. *Biotechnol Lett*, 2010, **32**(5), 593-600.

Galloway, W.R., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., Spring, D.R., Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev*, 2011, **111**(1), 28-67.

Gao, X., Jian, J., Li, W.-J., Yang, Y.-C., Shen, X.-W., Sun, Z.-R., Wu, Q., Chen, G.-Q., Genomic study of polyhydroxyalkanoates producing *Aeromonas hydrophila* 4AK4. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, **97**(20), 9099-9109.

García-Balboa, C., Bedoya, I.C., González, F., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A., Ballester, A., Bio-reduction of Fe(III) ores using three pure strains of *Aeromonas hydrophila*, *Serratia fonticola* and *Clostridium celerecrescens* and a natural consortium. *Bioresource Technol*, 2010, **101**(20), 7864-7871.

Garde, C., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Jakobsen, T.H., Hentzer, M., Claussen, A., Sneppen, K., Ferkinghoff-Borg, J., Sams, T., Quorum Sensing Regulation in *Aeromonas hydrophila*. *J Mol Biol*, 2010, **396**(4), 849-857.

Ge, Y., Li, C., Corum, L., Slaughter, C.A., Charon, N.W., Structure and Expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol*, 1998, **180**(9), 2418-2425.

Gerbersdorf, S., Bittner, R., Lubarsky, H., Manz, W., Paterson, D., Microbial assemblages as ecosystem engineers of sediment stability. *J Soil Sedim*, 2009, **9(6)**, 640-652.

Ghafoor, A., Hay, I.D., Rehm, B.H.A., Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77(15)**, 5238-5246.

González, A., Bellenberg, S., Mamani, S., Ruiz, L., Echeverría, A., Soulère, L., Doutheau, A., Demergasso, C., Sand, W., Queneau, Y., Vera, M., Guiliani, N., AHL signaling molecules with a large acyl chain enhance biofilm formation on sulfur and metal sulfides by the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, **97(8)**, 3729-3737.

Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., Culley, D.E., Reed, S.B., Romine, M.F., Saffarini, D.A., Hill, E.A., Shi, L., Elias, D.A., Kennedy, D.W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S.i., Logan, B., Nealson, K.H., Fredrickson, J.K., Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *P Natl Acad Sci*, 2006, **103(30)**, 11358-11363.

Gould, T.A., Herman, J., Krank, J., Murphy, R.C., Churchill, M.E.A., Specificity of Acyl-Homoserine Lactone Synthases Examined by Mass Spectrometry. *J Bacteriol*, 2006, **188(2)**, 773-783.

Gram, L., Siderophore-Mediated Iron Sequestering by *Shewanella putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60(6)**, 2132-2136.

Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M., Corthésy-Theulaz, I.E., Cell Surface-Associated Elongation Factor Tu Mediates the Attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to Human Intestinal Cells and Mucins. *Infect Immun*, 2004, **72(4)**, 2160-2169.

Guo, K., Freguia, S., Dennis, P.G., Chen, X., Donose, B.C., Keller, J., Gooding, J.J., Rabaey, K., Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation,

community composition, and current generation in bioelectrochemical systems. *Environ Sci Technol*, 2013, **47**(13), 7563-7570.

Haas, J.R., DiChristina, T.J., Effects of Fe(III) chemical speciation on dissimilatory Fe(III) reduction by *Shewanella putrefaciens*. *Environ Sci Technol*, 2002, **36**(3), 373-380.

Hallberg, K., González-Toril, E., Johnson, D., *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles*, 2010, **14**(1), 9-19.

Hallberg, K.B., Grail, B.M., Plessis, C.A.d., Johnson, D.B., Reductive dissolution of ferric iron minerals: A new approach for bio-processing nickel laterites. *Miner Eng*, 2011, **24**(7), 620-624.

Hammann, R., Ottow, J.C.G., Reductive Dissolution of Fe₂O₃ by Saccharolytic Clostridia and *Bacillus polymyxa* under anaerobic Conditions. *Z Pflanzenernährung Bodenkunde*, 1974, **137**(2), 108-115.

Harder, E.C., Iron depositing bacteria and their geological relations. *J Geol*, 1922, **30**(6), 506-509.

Hayes, C.S., Aoki, S.K., Low, D.A., Bacterial Contact-Dependent Delivery Systems. *Annu Rev Genet*, 2010, **44**(1), 71-90.

Huang, Y.L., Ki, J.S., Lee, O.O., Qian, P.Y., Evidence for the dynamics of Acyl homoserine lactone and AHL-producing bacteria during subtidal biofilm formation. *ISME J*, 2009, **3**(3), 296-304.

Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B., Kaplan, J.B., Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(2), 470-476.

Jayasinghearachchi, H.S., Singh, S., Sarma, P.M., Aginihotri, A., Lal, B., Fermentative hydrogen production by new marine *Clostridium amygdalinum* strain C9 isolated from offshore crude oil pipeline. *Int J Hydrog Energy*, 2010, **35**(13), 6665-6673.

- Johnson, D.B., Reductive dissolution of minerals and selective recovery of metals using acidophilic iron- and sulfate-reducing acidophiles. *Hydrometallurgy*, 2012, **127–128(0)**, 172-177.
- Johnson, D.B., Ghauri, M.A., McGinness, S., Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments. *FEMS Microbiol Rev*, 1993, **11(1-3)**, 63-70.
- Johnson, D.B., McGinness, S., Ferric iron reduction by acidophilic heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57(1)**, 207-211.
- Johnson, D.B., Stallwood, B., Kimura, S., Hallberg, K.B., Isolation and characterization of *Acidicaldus organivorus*, gen. nov., sp. nov.: a novel sulfur-oxidizing, ferric iron-reducing thermo-acidophilic heterotrophic Proteobacterium. *Arch Microbiol*, 2006, **185(3)**, 212-221.
- Jones, J.G., Gardener, S., Simon, B.M., Reduction of Ferric Iron by Heterotrophic Bacteria in Lake Sediments. *J Gen Microbiol*, 1984, **130(1)**, 45-51.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ram Kumar Pandian, S., Kottaisamy, M., BarathmaniKanth, S., Kartikeyan, B., Gurunathan, S., Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, **77(2)**, 257-262.
- Kappler, A., Benz, M., Schink, B., Brune, A., Electron shuttling via humic acids in microbial iron(III) reduction in a freshwater sediment. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, **47(1)**, 85-92.
- Kappler, A., Straub, K.L., Geomicrobiological Cycling of Iron. *Rev Mineral*, 2005, **59(1)**, 85-108.
- Karkhanis, Y.D., Zeltner, J.Y., Jackson, J.J., Carlo, D.J., A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Anal Biochem*, 1978, **85(2)**, 595-601.
- Karunakaran, E., Biggs, C.A., Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **89(4)**, 1161-1175.

- Kato, S., Hashimoto, K., Watanabe, K., Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *P Natl Acad Sci*, 2012, **109**(25), 10042-10046.
- Khajanchi, B.K., Sha, J., Kozlova, E.V., Erova, T.E., Suarez, G., Sierra, J.C., Popov, V.L., Horneman, A.J., Chopra, A.K., N-Acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology*, 2009, **155**(11), 3518-3531.
- Kim, H.J., Park, H.S., Hyun, M.S., Chang, I.S., Kim, M., Kim, B.H., A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme Microb Tech*, 2002, **30**, 145-152.
- Klimes, A., Franks, A.E., Glaven, R.H., Tran, H., Barrett, C.L., Qiu, Y., Zengler, K., Lovley, D.R., Production of pilus-like filaments in *Geobacter sulfurreducens* in the absence of the type IV pilin protein PilA. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, **310**(1), 62-68.
- Knight, V.V., Blakemore, R., Reduction of diverse electron acceptors by *aeromonas hydrophila*. *Arch Microbiol*, 1998, **169**(3), 239-248.
- Koestner, R., Roiter, Y., Kozhinova, I., Minko, S., Effect of Local Charge Distribution on Graphite Surface on Nafion Polymer Adsorption as Visualized at the Molecular Level. *J Phys Chem C*, 2011, **115**(32), 16019-16026.
- Koschorreck, M., Microbial sulphate reduction at a low pH. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, **64**(3), 329-342.
- Kraemer, S.M., Butler, A., Borer, P., Cervini-Silva, J., Siderophores and the Dissolution of Iron-Bearing Minerals in Marine Systems. *Rev Mineral*, 2005, **59**(1), 53-84.
- Küsel, K., Roth, U., Trinkwalter, T., Peiffer, S., Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments. *Environ Exp Bot*, 2001, **46**(3), 213-223.

Kumar, V., Yadav, S.C., Yadav, S.K., Syzygium cumini leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. *J Chem Technol Biot*, 2010, **85(10)**, 1301-1309.

Kundak, M., Lazic, L., Crnko, J., CO₂ Emissions in the steel industry. *Metalurgija*, 2009, **48(3)**, 193-197.

Kusel, K., Dorsch, T., Acker, G., Stackebrandt, E., Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65(8)**, 3633-3640.

Labbate, M., Zhu, H., Thung, L., Bandara, R., Larsen, M.R., Willcox, M.D., Givskov, M., Rice, S.A., Kjelleberg, S., Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *J Bacteriol*, 2007, **189(7)**, 2702-2711.

Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227(5259)**, 680-685.

Langworthy, T.A., D. J. KUSHNER (Editor). *Microbial life in extreme environments*. London – New York – San Francisco 1978. Academic Press. *Z allg Mikrobiol*, 1979, **19(6)**, 447-447.

Larese-Casanova, P., Haderlein, S.B., Kappler, A., Biomineralization of lepidocrocite and goethite by nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacteria: Effect of pH, bicarbonate, phosphate, and humic acids. *Geochim Cosmochim Ac*, 2010, **74(13)**, 3721-3734.

Larsen, O., Postma, D., Kinetics of reductive bulk dissolution of lepidocrocite, ferrihydrite, and goethite. *Geochim Cosmochim Ac*, 2001, **65(9)**, 1367-1379.

Lapidou, C.S., Rittmann, B.E., A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res*, 2002, **36(11)**, 2711-2720.

Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W., Kuhlicke, U., Neu, T.R., In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Can J Microbiol*, 2007, **53(3)**, 450-458.

- Lee, J.-H., Roh, Y., Kim, K.-W., Hur, H.-G., Organic acid-dependent iron mineral formation by a newly isolated iron-reducing bacterium, *Shewanella* sp. HN-41. *Geomicrobiol J*, 2007, **24**(1), 31-41.
- Li, H., Feng, Y., Lu, S., Du, Z., Bio-leaching of valuable metals from marine nodules under anaerobic condition. *Miner Eng*, 2005, **18**(15), 1421-1422.
- Linton, D., Allan, E., Karlyshev, A.V., Cronshaw, A.D., Wren, B.W., Identification of N-acetylgalactosamine-containing glycoproteins PEB3 and CgpA in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol*, 2002, **43**(2), 497-508.
- Liu, C., Zachara, J.M., Gorby, Y.A., Szecsody, J.E., Brown, C.F., Microbial reduction of Fe(III) and sorption/precipitation of Fe(II) on *Shewanella putrefaciens* Strain CN32. *Environ Sci Technol*, 2001, **35**(7), 1385-1393.
- Liu, H.L., Dai, S.A., Fu, K.Y., Hsu, S.H., Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane. *Int J Nanomedicine*, 2010, **5**, 1017-1028.
- Lovley, D., 2013. Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-Reducing Prokaryotes, In *The Prokaryotes*, eds. Rosenberg, E., DeLong, E., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. Springer Berlin Heidelberg, pp. 287-308.
- Lovley, D.R., Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol Rev*, 1991, **55**(2), 259-287.
- Lovley, D.R., Fraga, J.L., Blunt-Harris, E.L., Hayes, L.A., Phillips, E.J.P., Coates, J.D., Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta hydroch hydrob*, 1998, **26**(3), 152-157.
- Lovley, D.R., Giovannoni, S.J., White, D.C., Champine, J.E., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., Goodwin, S., *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch Microbiol*, 1993a, **159**(4), 336-344.
- Lovley, D.R., Holmes, D.E., Nevin, K.P., 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction, In *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 219-286.

- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., Availability of ferric iron for microbial reduction in bottom sediments of the freshwater Tidal Potomac River. *Appl Environ Microbiol*, 1986a, **52(4)**, 751-757.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1986b, **51(4)**, 683-689.
- Lovley, D.R., Roden, E.E., Phillips, E.J.P., Woodward, J.C., Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria. *Mar Geol*, 1993b, **113(1-2)**, 41-53.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193(1)**, 265-275.
- Luef, B., Fakra, S.C., Csencsits, R., Wrighton, K.C., Williams, K.H., Wilkins, M.J., Downing, K.H., Long, P.E., Comolli, L.R., Banfield, J.F., Iron-reducing bacteria accumulate ferric oxyhydroxide nanoparticle aggregates that may support planktonic growth. *ISME J*, 2013, **7(2)**, 338-350.
- Luu, Y.S., Ramsay, J.A., Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe(III) as an energy source. *World J Microb Biot*, 2003, **19(2)**, 215-225.
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E., Williams, P., The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol*, 2002, **4(1)**, 18-28.
- Lyon, G.J., Novick, R.P., Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides*, 2004, **25(9)**, 1389-1403.
- Maddocks, S.E., Oyston, P.C., Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 2008, **154(Pt 12)**, 3609-3623.
- Malhotra, A., Dolma, K., Kaur, N., Rathore, Y.S., Ashish, Mayilraj, S., Choudhury, A.R., Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using a novel marine strain of *Stenotrophomonas*. *Bioresour Technol*, 2013, **142**, 727-731.
- Malvankar, N.S., Lovley, D.R., Microbial nanowires for bioenergy applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, **27(0)**, 88-95.

Marquina, D., Santos de la Sen, A., Procesos biológicos regulados por quorum sensing. *Reduca (Biología)*, 2010, **3(5)**, 56-74.

Marsili, E., Baron, D.B., Shikhare, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., Bond, D.R., *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *P Natl Acad Sci*, 2008, **105(10)**, 3968-3973.

May, A., Sjöberg, J.J., Baglin, E.G., Synthetic argentojarosite: physical properties and thermal behavior. *Am Mineral*, 1973, **58(9-10)**, 936-994.

McFaddin, J.F., *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2000, The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

Mortimer, R.J.G., Coleman, M.L., Microbial influence on the oxygen isotopic composition of diagenetic siderite. *Geochim Cosmochim Acta*, 1997, **61(8)**, 1705-1711.

Munch, J.C., Ottow, J.C.G., Reductive transformation mechanism of ferric oxides in hydromorphic soils. *Ecol Bull*, 1983, **35**, 383-394.

Myers, C., Nealson, K., Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol*, 1990, **172(11)**, 6232-6238.

Myers, C.R., Carstens, B.P., Antholine, W.E., Myers, J.M., Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Appl Microbiol*, 2000, **88(1)**, 98-106.

Myers, C.R., Myers, J.M., Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol*, 1992, **174(11)**, 3429-3438.

Nasser, W., Reverchon, S., New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal Bioanal Chem*, 2007, **387(2)**, 381-390.

Neu, T.R., Lawrence, J.R., Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, **24(1)**, 11-25.

Neu, T.R., Lawrence, J.R., 2010. Chapter 37 - Extracellular polymeric substances in microbial biofilms, In *Microbial Glycobiology*, eds. Otto, H., Patrick, J.B., Mark von Itzstein A2 - Otto Holst, P.J.B., Mark von, I. Academic Press, San Diego, pp. 733-758.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 1988, **9(6)**, 255-262.

Nevin, K.P., Lovley, D.R., Mechanisms for Fe(III) oxide reduction in sedimentary environments. *Geomicrobiol J*, 2002, **19(2)**, 141-159.

Newbury, D.E., Joy, D.C., Echlin, P., Fiori, C.E., Goldstein, J.I., 1986. *Advanced Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Plenum Press, p. 454.

Ng, W.L., Bassler, B.L., Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet*, 2009, **43**, 197-222.

Nordstrom, D.K., Alpers, C.N., Negative pH, efflorescent mineralogy, and consequences for environmental restoration at the Iron Mountain Superfund site, California. *P Natl Acad Sci*, 1999, **96(7)**, 3455-3462.

Norton, G.A., Richardson, R.G., Markuszewski, R., Levine, A.D., Precipitation of jarosite compounds as a method for removing impurities from acidic wastes from chemical coal cleaning. *Environ Sci Technol*, 1991, **25(3)**, 449-455.

O'Reilly, T., Day, D.F., Effects of cultural conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **45(3)**, 1132-1135.

Ohmura, N., Sasaki, K., Matsumoto, N., Saiki, H., Anaerobic respiration using Fe(3+), S(0), and H(2) in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol*, 2002, **184(8)**, 2081-2087.

Olson, G.J., Brierley, J.A., Brierley, C.L., Bioleaching review part B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **63(3)**, 249-257.

Ottow, J.C., Von Klopotek, A., Enzymatic reduction of iron oxide by fungi. *Appl Microbiol*, 1969, **18**(1), 41-43.

Ottow, J.C.G., Bacterial mechanism of gley formation in artificially submerged soil. *Nature*, 1970, **225**(5227), 103-103.

Ottow, J.C.G., Glathe, H., Isolation and identification of iron-reducing bacteria from gley soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1971, **3**(1), 43-55.

Pancholi, V., Chhatwal, G.S., Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol*, 2003, **293**(6), 391-401.

Papassiopi, N., Vaxevanidou, K., Paspaliaris, I., Effectiveness of iron reducing bacteria for the removal of iron from bauxite ores. *Miner Eng*, 2010, **23**(1), 25-31.

Pautsch, A., Schulz, G.E., Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol*, 1998, **5**(11), 1013-1017.

Perez-Gonzalez, T., Jimenez-Lopez, C., Neal, A.L., Rull-Perez, F., Rodriguez-Navarro, A., Fernandez-Vivas, A., Iañez-Pareja, E., Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*. *Geochim Cosmochim Acta*, 2010, **74**(3), 967-979.

Pester, M., Brambilla, E., Alazard, D., Rattei, T., Weinmaier, T., Han, J., Lucas, S., Lapidus, A., Cheng, J.F., Goodwin, L., Pitluck, S., Peters, L., Ovchinnikova, G., Teshima, H., Detter, J.C., Han, C.S., Tapia, R., Land, M.L., Hauser, L., Kyrpides, N.C., Ivanova, N.N., Pagani, I., Huntmann, M., Wei, C.L., Davenport, K.W., Daligault, H., Chain, P.S., Chen, A., Mavromatis, K., Markowitz, V., Szeto, E., Mikhailova, N., Pati, A., Wagner, M., Woyke, T., Ollivier, B., Klenk, H.P., Spring, S., Loy, A., Complete genome sequences of *Desulfosporosinus orientis* DSM765T, *Desulfosporosinus youngiae* DSM17734T, *Desulfosporosinus meridiei* DSM13257T, and *Desulfosporosinus acidiphilus* DSM22704T. *J Bacteriol*, 2012, **194**(22), 6300-6301.

Petrie, L., North, N.N., Dollhopf, S.L., Balkwill, D.L., Kostka, J.E., Enumeration and characterization of iron(III)-reducing microbial communities from acidic subsurface sediments contaminated with uranium(VI). *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(12), 7467-7479.

- Petty, M.C., *Molecular Electronics: From Principles to Practice*. 2007, Wiley.
- Pronk, J.T., de Bruyn, J.C., Bos, P., Kuenen, J.G., Anaerobic Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(7), 2227-2230.
- Reardon, C.L., Dohnalkova, A.C., Nachimuthu, P., Kennedy, D.W., Saffarini, D.A., Arey, B.W., Shi, L., Wang, Z., Moore, D., McLean, J.S., Moyles, D., Marshall, M.J., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K., Beliaev, A.S., Role of outer-membrane cytochromes MtrC and OmcA in the biomineralization of ferrihydrite by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Geobiology*, 2010, **8**(1), 56-68.
- Reddy, A.S., Chen, C.Y., Chen, C.C., Jean, J.S., Chen, H.R., Tseng, M.J., Fan, C.W., Wang, J.C., Biological synthesis of gold and silver nanoparticles mediated by the bacteria *Bacillus subtilis*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010, **10**(10), 6567-6574.
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., Lovley, D.R., Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 2005, **435**(7045), 1098-1101.
- Reguera, G., Nevin, K.P., Nicoll, J.S., Covalla, S.F., Woodard, T.L., Lovley, D.R., Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(11), 7345-7348.
- Richardson, D.J., Butt, J.N., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Shi, L., Edwards, M.J., White, G., Baiden, N., Gates, A.J., Marritt, S.J., Clarke, T.A., The 'porin-cytochrome' model for microbe-to-mineral electron transfer. *Mol Microbiol*, 2012, **85**(2), 201-212.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Høiby, N., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L., N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology*, 2001, **147**(12), 3249-3262.
- Roberts, J.A., Fowle, D.A., Hughes, B.T., Kulczycki, E., Attachment behavior of *Shewanella putrefaciens* onto magnetite under aerobic and anaerobic conditions. *Geomicrobiol J*, 2006, **23**(8), 631-640.

Robles-Arenas, V.M., 2007. Caracterización hidrogeológica de la Sierra de Cartagena-La Unión (SE de la Península Ibérica). Impacto de la minería abandonada sobre el medio hídrico. Universidad Politécnica de Cataluña.

Robles-Arenas, V.M., Rodríguez, R., García, C., Manteca, J.I., Candela, L., Sulphide-mining impacts in the physical environment: Sierra de Cartagena–La Unión (SE Spain) case study. *Environ Geol*, 2006, **51**(1), 47-64.

Roden, E.E., Urrutia, M.M., Ferrous Iron Removal Promotes Microbial Reduction of Crystalline Iron(III) Oxides. *Environ Sci Technol*, 1999, **33**(11), 1847-1853.

Roden, E.E., Urrutia, M.M., Influence of biogenic Fe(II) on bacterial crystalline Fe(III) oxide reduction. *Geomicrobiol J*, 2002, **19**(2), 209-251.

Roden, E.E., Zachara, J.M., Microbial reduction of crystalline iron(iii) oxides: influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environ Sci Technol*, 1996, **30**(5), 1618-1628.

Roh, Y., Gao, H., Vali, H., Kennedy, D.W., Yang, Z.K., Gao, W., Dohnalkova, A.C., Stapleton, R.D., Moon, J.W., Phelps, T.J., Fredrickson, J.K., Zhou, J., Metal reduction and iron biomineralization by a psychrotolerant Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella* sp. strain PV-4. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(5), 3236-3244.

Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W., Bioleaching review part A. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 2003, **63**(3), 239-248.

Ruebush, S.S., Brantley, S.L., Tien, M., Reduction of soluble and insoluble iron forms by membrane fractions of *Shewanella oneidensis* grown under aerobic and anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(4), 2925-2935.

Salas, E.C., Berelson, W.M., Hammond, D.E., Kampf, A.R., Nealson, K.H., The impact of bacterial strain on the products of dissimilatory iron reduction. *Geochim Cosmochim Ac*, 2010, **74**(2), 574-583.

Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edition). 1989.

Sanchez-Andrea, I., Knittel, K., Amann, R., Amils, R., Sanz, J.L., Quantification of Tinto River sediment microbial communities: importance of sulfate-reducing bacteria and their role in attenuating acid mine drainage. *Appl Environ Microbiol*, 2012, **78(13)**, 4638-4645.

Sánchez, L., Cruells, M., Roca, A., Sulphidization-cyanidation of jarosite species: Applicability to the gossan ores of Rio Tinto. *Hydrometallurgy*, 1996, **42(1)**, 35-49.

Scala, D.J., Hacherl, E.L., Cowan, R., Young, L.Y., Kosson, D.S., Characterization of Fe(III)-reducing enrichment cultures and isolation of Fe(III)-reducing bacteria from the Savannah River site, South Carolina. *Res Microbiol*, 2006, **157(8)**, 772-783.

Scott, D.T., McKnight, D.M., Blunt-Harris, E.L., Kolesar, S.E., Lovley, D.R., Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms. *Environ Sci Technol*, 1998, **32(19)**, 2984-2989.

Schaefer, A.L., Hanzelka, B.L., Eberhard, A., Greenberg, E.P., Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J Bacteriol*, 1996, **178(10)**, 2897-2901.

Schertzer, J.W., Boulette, M.L., Whiteley, M., More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Trends Microbiol*, 2009, **17(5)**, 189-195.

Schröder, I., Johnson, E., de Vries, S., Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, **27(2-3)**, 427-447.

Seeliger, S., Cord-Ruwisch, R., Schink, B., A periplasmic and extracellular c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *J Bacteriol*, 1998, **180(14)**, 3686-3691.

Seidel, J., Hoffmann, M., Ellis, K.E., Seidel, A., Spatzal, T., Gerhardt, S., Elliott, S.J., Einsle, O., MacA is a second cytochrome c peroxidase of *Geobacter sulfurreducens*. *Biochemistry*, 2012, **51(13)**, 2747-2756.

Seltmann, G., Holst, O., *The Bacterial Cell Wall*. 2002, Springer.

Seshadri, R., Joseph, S.W., Chopra, A.K., Sha, J., Shaw, J., Graf, J., Haft, D., Wu, M., Ren, Q., Rosovitz, M.J., Madupu, R., Tallon, L., Kim, M., Jin, S., Vuong, H., Stine, O.C., Ali, A., Horneman, A.J., Heidelberg, J.F., Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: Jack of all trades. *J Bacteriol*, 2006, **188**(23), 8272-8282.

Shen, R., Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., Determination of main components in the extracellular polymeric substances extracted from activated sludge using a spectral probing method. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, **94**(0), 151-156.

Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., Li, X.-Y., Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol Adv*, 2010, **28**(6), 882-894.

Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., Wang, C.-M., FTIR-spectral analysis of two photosynthetic H₂-producing strains and their extracellular polymeric substances. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **73**(1), 204-210.

Shinde, M., Patil, R., Karmakar, S., Bhoraskar, S., Rane, S., Gade, W., Amalnerkar, D., Antimicrobial properties of uncapped silver nanoparticles synthesized by DC arc thermal plasma technique. *J Nanosci Nanotechnol*, 2012, **12**(2), 887-893.

Silverman, M.P., Lundgren, D.G., Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. II. Manometric studies. *J Bacteriol*, 1959, **78**, 326-331.

Sirover, M.A., New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1432**(2), 159-184.

Smith, M.E., Finke, E.H., Critical Point Drying of Soft Biological Material for the Scanning Electron Microscope. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1972, **11**(3), 127-132.

Stevens, A.M., Queneau, Y., Soulere, L., von Bodman, S., Doutheau, A., Mechanisms and synthetic modulators of AHL-dependent gene regulation. *Chem Rev*, 2011, **111**(1), 4-27.

Stintzi, A., Barnes, C., Xu, J., Raymond, K.N., Microbial iron transport via a siderophore shuttle: A membrane ion transport paradigm. *P Natl Acad Sci*, 2000, **97(20)**, 10691-10696.

Stookey, L., Ferrozine---a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem*, 1970, **42(7)**, 779-781.

Straub, K.L., Benz, M., Schink, B., Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **34(3)**, 181-186.

Štyriaková, I., 'Factors affecting bioleaching in the process of non-metallics. *Nova Biotechnologica*, 2007, **7**, 11-16.

Summers, Z.M., Fogarty, H.E., Leang, C., Franks, A.E., Malvankar, N.S., Lovley, D.R., Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. *Science*, 2010, **330(6009)**, 1413-1415.

Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E.L., Winson, M.K., Chhabra, S.R., Williams, P., Macintyre, S., Stewart, G.S., Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. *J Bacteriol*, 1997, **179(17)**, 5271-5281.

Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomas, J.M., Stewart, G.S., Williams, P., Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun*, 1999, **67(10)**, 5192-5199.

Syed, A., Saraswati, S., Kundu, G.C., Ahmad, A., Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Humicola* sp. and evaluation of their cytotoxicity using normal and cancer cell lines. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2013, **114C**, 144-147.

Torres, C.I., Marcus, A.K., Lee, H.-S., Parameswaran, P., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, **34(1)**, 3-17.

Trevelyan, W.E., Forrest, R.S., Harrison, J.S., Determination of Yeast Carbohydrates with the Anthrone Reagent. *Nature*, 1952, **170(4328)**, 626-627.

Urrutia, M.M., Roden, E.E., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Microbial and surface chemistry controls on reduction of synthetic Fe(III) oxide minerals by the dissimilatory iron-reducing bacterium *Shewanella alga*. *Geomicrobiol J*, 1998, **15(4)**, 269-291.

Urrutia, M.M., Roden, E.E., Zachara, J.M., Influence of Aqueous and Solid-Phase Fe(II) Complexants on Microbial Reduction of Crystalline Iron(III) Oxides†. *Environ Sci Technol*, 1999, **33(22)**, 4022-4028.

Vargas, M., Malvankar, N.S., Tremblay, P.-L., Leang, C., Smith, J.A., Patel, P., Synoeyenbos-West, O., Nevin, K.P., Lovley, D.R., Aromatic amino acids required for pili conductivity and long-range extracellular electron transport in *Geobacter sulfurreducens*. *mBio*, 2013, **4(2)**.

Vaxevanidou, K., Papassiopi, N., Paspaliaris, I., Removal of heavy metals and arsenic from contaminated soils using bioremediation and chelant extraction techniques. *Chemosphere*, 2008, **70(8)**, 1329-1337.

Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C.M., Hardie, K.R., Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3(5)**, 383-396.

Vera, M., Schippers, A., Sand, W., Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013.

Vestola, E.A., Kuusenaho, M.K., Närhi, H.M., Tuovinen, O.H., Puhakka, J.A., Plumb, J.J., Kaksonen, A.H., Acid bioleaching of solid waste materials from copper, steel and recycling industries. *Hydrometallurgy*, 2010, **103(1-4)**, 74-79.

Viñals, J., Roca, A., Cruells, M., Núñez, C., Characterization and cyanidation of Rio Tinto gossan ores. *Can Metall Quart*, 1995, **34(2)**, 115-122.

Virgili, A., *Introducción a la fertilización con microelementos*. 1991, Comercial Química Massó.

von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S., Lloyd, J.R., Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(3), 615-623.

Wade, R., DiChristina, T.J., Isolation of U(VI) reduction-deficient mutants of *Shewanella putrefaciens*. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **184**(2), 143-148.

Wang, X.-J., Yang, J., Chen, X.-P., Sun, G.-X., Zhu, Y.-G., Phylogenetic diversity of dissimilatory ferric iron reducers in paddy soil of Hunan, South China. *J Soils Sedim*, 2009, **9**(6), 568-577.

Waters, C.M., Bassler, B.L., Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, **21**, 319-346.

Weisener, C.G., Babechuk, M.G., Fryer, B.J., Maunder, C., Microbial dissolution of silver jarosite: examining its trace metal behaviour in reduced environments. *Geomicrobiol J*, 2008, **25**(7-8), 415-424.

Winson, M.K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S.R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G.P., Bycroft, B.W., Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *P Natl Acad Sci*, 1995, **92**(20), 9427-9431.

Xolalpa, W., Vallecillo, A.J., Lara, M., Mendoza-Hernandez, G., Comini, M., Spallek, R., Singh, M., Espitia, C., Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*, 2007, **7**(18), 3332-3341.

Yahya, A., Hallberg, K.B., Johnson, D.B., Iron and carbon metabolism by a mineral-oxidizing *Alicyclobacillus*-like bacterium. *Arch Microbiol*, 2008, **189**(4), 305-312.

Zachara, J.M., Kukkadapu, R.K., Fredrickson, J.K., Gorby, Y.A., Smith, S.C., Biomineralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB). *Geomicrobiol J*, 2002, **19**(2), 179-207.

Zhang, X., Bishop, P.L., Kinkle, B.K., Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Sci Technol*, 1999, **39(7)**, 211-218.

Zhang, Y.L., Ong, C.T., Leung, K.Y., Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology*, 2000, **146(4)**, 999-1009.

Zippel, B., Neu, T.R., Characterization of glycoconjugates of extracellular polymeric substances in tufa-associated biofilms by using fluorescence Lectin-Binding Analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77(2)**, 505-516.

ANEXO



Effectiveness of anaerobic iron bio-reduction of jarosite and the influence of humic substances

Laura Castro, Camino García-Balboa, Felisa González, Antonio Ballester*, M. Luisa Blázquez, Jesús A. Muñoz

Departamento de Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2012

Received in revised form 27 September 2012

Accepted 6 October 2012

Available online 12 October 2012

Keywords:

Iron-reducing bacteria

Jarosite

Anaerobic Fe(III) reduction

Bioleaching

Humic substances

ABSTRACT

Nowadays there is a growing interest in developing clean mining processes free of toxic chemicals. Biotechnology could be a cost-effective and environmentally friendly alternative to traditional leaching methods. Jarosite is an important sulfate mineral that occurs naturally and also can be produced as a waste in industrial processes. In this work, bioreduction of jarosite using *Shewanella putrefaciens* and a natural consortium under anaerobic conditions is presented as an acceptable bioleaching method. Moreover, the influence of humic substances that appear in natural environments acting as electron shuttles between microorganisms and insoluble oxides has been investigated. One key factor for the industrial implementation of anaerobic bioleaching is the metal recovery from minerals. The precipitates formed as products of dissimilatory iron reduction, the bacterial ability to obtain ferrous ions in solution and the stimulation of insoluble Fe(III) ores reduction by electron shuttles have been examined in this research.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Solid wastes from mining and metallurgy, energy production and recycling industries may contain a relatively high level of metals and can be considered as potentially valuable sources of metals (Vestola et al., 2010).

Metal solubilization in chemical leaching processes with strong acids is favorable when there are high levels of metals in wastes. The development of alternative methods when there are relatively low levels of metals has focused the interest. Biological options involve considerably less energy or reagent expenditure and consequently are more cost-effective and environmentally friendly (Hallberg et al., 2011; Papassiopi et al., 2010).

It is well known that the dissimilatory iron reducing bacteria play an important role in the biochemical cycling of iron in soils and sediments, where Fe(III) minerals participate as terminal electron acceptors. Anaerobic iron bioleaching is ubiquitous in subsurface environments, including mining-impacted areas. In addition, oxygen is not required and acid generation and CO₂ emissions are avoided in anaerobic bioleaching (Li et al., 2005). In consequence, anaerobic bioleaching may be an attractive alternative for iron extraction from recalcitrant ores and re-processing waste materials from mining operations with remarkable environmental benefits.

Humic substances are ubiquitous in soils and sediments and are formed from the degradation of plants, animals and microorganisms. The major functional groups in humic substances are carboxylic acids, phenolic and alcoholic hydroxyl, ketones and quinones. Humic substances influence the toxicity and transport of heavy metals. They can form complexes with metal ions and also alter the speciation of the metal through oxidation–reduction reactions. Humic acids play a key role as electron acceptors in microbial respiration. Dissimilatory iron-reducing bacteria oxidize organic compounds by transferring electrons to humic substances. The reduced humics can then abiotically transfer electrons to Fe(III), regenerating the oxidized form of the humics. This electron shuttling alleviates the need for bacteria to establish direct contact with the Fe(III) oxides to reduce them (Liu et al., 2001; Luu et al., 2003). Therefore, there are environments, especially those that are low in natural organic matter, with insignificant quantities of electron-shuttling compounds. In such cases, the addition of humic acids or other quinines can stimulate Fe(III) reduction.

Fe(III) has a very low solubility and is usually present as insoluble oxides at neutral pH. One of the main challenges for the industrial implementation of anaerobic bioleaching, as well as a decisive research stage, is the adaptation of microbial cultures to grow on iron minerals instead of soluble sources of ferric iron. Neutrophilic Fe-reducing bacteria have also been shown to cause the reductive dissolution of some ferric iron minerals. One important difference between ferric iron and other electron acceptors is that it can form different oxides and hydroxides with different crystalline structures and oxidation states of the metal. This fact has an important effect on its bioavailability (Bonneville et al., 2009). In general, the more crystalline the Fe(III) oxide, the less susceptible it is to microbial reduction. Bioreduction

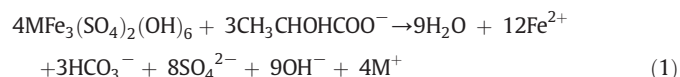
* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4339; fax: +34 91 394 4357.

E-mail addresses: lcastor@quim.ucm.es (L. Castro), abipsoferro1@yahoo.es (C. García-Balboa), fgonzalezg@quim.ucm.es (F. González), ambape@quim.ucm.es (A. Ballester), mlblazquez@quim.ucm.es (M.L. Blázquez), jamunoz@quim.ucm.es (J.A. Muñoz).

of amorphous Fe(III) minerals has been extensively studied due to their poor crystalline structure in contrast with the few studies on crystalline compounds (Lovley et al., 1998).

Jarosites, $\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, are important iron sulfate minerals that occur in acid mine drainage environments. Moreover, jarosite has applications in base metal recovery industries. Jarosite precipitation is used in Zn industry to extract iron impurities from Zn-sulfide ores and these compounds are potential hosts for metals such as lead and silver.

However, despite the relevance of jarosite minerals, few studies have evaluated the biotic dissolution of jarosites (Bridge and Johnson, 2000; Coggon et al., 2012; Jones et al., 2006). Jarosite can be susceptible of microbial reduction. Natrojarosite reduction chemistry has been studied (Ergas et al., 2006). Assuming that the Gibbs free energy of formation of K-jarosite is -6 kJ/mol , jarosite reduction could provide the energy required for iron reducing bacteria using lactate as electron donor following the equation:



Previous works have mostly used pure bacterial cultures and synthetic jarosite. Furthermore, the effect of quinones as electron acceptors for microorganisms were studied with poorly crystalline Fe(III) oxides in most of the cases (Kappler et al., 2004). The present work is focused on the anaerobic bioleaching of jarosite, a crystalline and abundant mineral, using two different cultures: a pure strain of *Shewanella putrefaciens* and a natural consortium. The kinetics of dissimilatory Fe(III) reduction was studied in the presence of the humic substances using the humic analog anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) to catalyze the process and keep ferrous iron in solution in an attempt to improve the potential application of bioleaching.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial cultures and media

The natural consortium for the microbial study was collected from the edge of an open-pit lake surrounding an abandoned mine site named “Brunita” (formerly a source of Pb–Zn ores) near La Unión (Murcia, Spain). The culture of *S. putrefaciens* came from the *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ).

All the cultures were grown in modified Postgate C medium supplemented with jarosites provided as electron acceptor (60 mM Fe^{3+}). The modified Postgate C medium contained the following salts (g/l): KH_2PO_4 , 0.5; NH_4Cl , 1.0; Na_2SO_4 , 4.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.06; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.06; sodium lactate, 6.0; yeast extract, 1.0; FeSO_4 , 0.004; and sodium citrate heptahydrate, 0.3. pH was adjusted to 7.0 ± 0.2 . Growth bacterial studies in the presence of AQDS were carried out in the same basal medium at a final concentration of 100 μM .

Standard anaerobic techniques were used in this research. Aerobic sterilized media (autoclave conditions: 121 °C, 30 min) was dispensed into the individual glass flasks and the mineral was added. Then, the solution was vigorously bubbled with N_2/CO_2 (80/20, v/v) to strip dissolved oxygen. The flasks were capped with butyl rubber stoppers and sealed with aluminum crimps. A 10% inoculum of active Fe(III)-reducing enrichment cultures was used. The cultures were incubated unstirred at 30 °C in the dark.

2.2. Synthesis of jarosite

The crystalline ammonium jarosite was biosynthesized by means of a pure culture of *Sulfolobus metallicus* grown in Norris medium. The basal medium composition was the following (salts expressed in g l^{-1}): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4; K_2HPO_4 , 0.2 and 50 mM

of ferrous iron. The pH was adjusted to pH 1.8. Cultures were grown on Erlenmeyer flasks under shaking conditions (250 rpm) at 70 ± 3 °C. Once formed, jarosites were recovered, washed with acid water and dried at room temperature. XRD analysis confirmed the composition of the solid formed as ammonium and potassium jarosites.

2.3. Kinetic tests

The kinetic of ferric reduction was tested in vials containing 54 ml of Postgate C medium supplemented with jarosite (60 mM in Fe^{3+}). An inoculum of 6 ml, obtained previously after more than ten successive transfers in the same conditions, was added at the start of the experiment. Inoculated tests were maintained in anaerobic and static conditions, in the dark at 30 ± 2 °C. In addition, chemical controls prepared with cell-free culture medium were performed in order to evaluate the extent of aqueous chemical reactions that might also occur. All reported data of kinetic tests were averages of two parallel bottles. In order to avoid any discrepancy caused by physiological changes of the bacterial culture, all experiments were inoculated from the same bottle of inoculum as described by Li et al. (2006).

2.4. Monitoring cultures: sampling and analysis

The kinetic study of dissimilatory Fe(III)-reducing cultures was monitored by taking samples at different sampling-times. The parameters selected for checking growth were the concentration of Fe^{2+} and the concentration of total iron. Fe^{2+} and Fe_{total} were measured in the same acid extraction solution.

For sampling, 0.5 ml of the sterile gas mixture (N_2/CO_2 , 80/20 v/v) was injected into the anaerobic vial and 0.5 ml of each sample was withdrawn. Sampling was performed with a deoxygenated and sterile syringe. The syringes were oxygen cleaned by previously injecting a sterile mixture of N_2/CO_2 , in order to displace oxygen that eventually entered into the system. The sterilization of the flux was obtained by passing the mixture of gases through a sterile filter of 0.22 μm . Samples, once taken, were immediately transferred to the extraction solution in order to prevent the oxidation of iron.

Vials were sampled in a different way: two replicates were taken from the clarified supernatant solution at settlement vials and another two replicates from shaking vials. This sampling method let us to determine the speciation of iron in both the solid and liquid phases. Samples taken at decanted vials served for determining the concentration of dissolved species: $\text{Fe}^{2+}(\text{aq})$ and $\text{Fe}_{\text{total}}(\text{aq})$. Samples taken at agitated vials served to determine the concentration of HCl-extractable Fe(II) and HCl-extractable Fe(total) (that is the sum of Fe(II) + Fe(III)).

The duplicate samples of 0.5 ml were removed from each culture at selected sampling times and placed in tubes containing the extraction solution (0.5 ml HCl solution 50% v/v) and heated to get the dissolution of solid phase. Then 4.0 ml of deionized water was added. HCl-extractable Fe^{2+} was determined by the ferrozine method (Stookey, 1970). Ferrous concentration was spectrophotometrically determined by measuring the absorbance of the ferrozine-Fe(II) complex at 562 nm after 5 min of color development. Standards of ferrous iron for the ferrozine assay were prepared with ferrous ethylene diammonium sulfate tetrahydrate dissolved in 0.5 N HCl (Lee et al., 2007). HCl-extractable total iron was determined in the same acid diluted solution by atomic absorption spectroscopy in a Perkin-Elmer HGA 700.

2.5. X-ray diffraction analysis

Precipitates in culture vials were recovered and preserved for identification. Oxidation was prevented by keeping samples in anaerobic conditions before analysis by bubbling a gas mixture of CO_2/N_2 (80/20 v/v).

Mineralogical characterization was carried out by powder X-ray diffraction (XRD) on a Philips X'pert-MPD equipment with a Cu anode operating at a wavelength of 1.5406 Å as the radiance source. Powdered samples were placed on off-axis quartz plates (18 mm diameter × 0.5 mm DP cavity). The scanning range was from 10° to 60° 2θ with an angular interval of 0.05° and 4 s counting time. The crystalline phases were identified using standard cards from the International Centre for Diffraction Data (ICDD, Newtown Square, Pennsylvania) Powder Diffraction File database.

2.6. Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM)

Cultures were grown on lactate/jarosite medium and filtered onto a 0.2 µm pore-size filters. The samples were successively dehydrated with acetone and stored overnight at 4 °C in 100% acetone. The samples were dried by critical-point drying and coated with graphite and gold.

Solid phase specimens were examined with a JEOL JSM-6330F microscope, FE-SEM at 10 kV, to determinate the spatial distribution of bacteria with respect to the mineral grains.

3. Results and discussion

Our research interest was focused on the capability of different bacterial cultures, a pure culture of *S. putrefaciens* and a prokaryotic consortium, to reduce jarosite.

Firstly, the jarosite was characterized by SEM (Fig. 1A) and XRD analysis (Fig. 1B). Both studies confirmed the authenticity of the mineral produced by *S. metallicus*. The solid formed was a mixture of ammonium and potassium jarosites.

The reduction of Fe(III) in jarosite was evident because a color change between the controls and the inoculated tests was observed. Raw jarosites had a yellow color while *S. putrefaciens* sample changed to pale green and the microbial consortium formed a great amount of black precipitate.

The metabolic respiration of microbes was evaluated over time monitoring Fe(II) formation. Both bacterial cultures reduced the jarosite under anaerobic conditions. By contrast, the control treatment without cell incubated at 30 °C was unable to produce Fe(II) (Fig. 2).

Reduction of Fe(II) by the prokaryotic consortium was fast and effective: the maximum level of iron bioreduction (~70%) took place in six days (Fig. 3). However, Fe(II) did not remain in solution.

On the other hand, an interesting and advantageous aspect of *S. putrefaciens* was that a high quantity of total Fe(II) produced

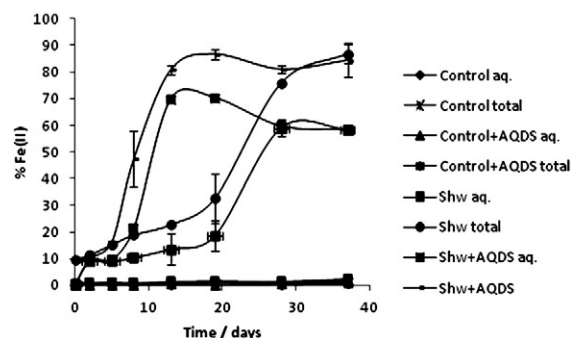


Fig. 2. Production of soluble and total Fe(II) in *Shewanella putrefaciens* culture. Jarosite was used at 3 g/l as the only source of iron. All Fe(II) measurements were performed in duplicate by means of ferrozine method and standard deviation ($n=2$) is shown in each data point. Error bars not visible are smaller than symbols.

remained in solution (Fig. 2). *S. putrefaciens* growth on jarosite reached a maximum Fe(III) reduction of 85% after one month. Moreover, this culture was able to reduce and solubilize approximately the 60% of the iron present in the jarosite.

The prokaryotic consortium characterized by molecular analysis (DGGE) (García-Balboa et al., 2010) showed the presence of *Clostridium*, *Serratia* and *Aeromonas* sp. which suggests that fermentative and respiratory processes take place in real conditions. In this case, the mixed culture might have been expected to reduce Fe(III) more efficiently than the pure culture through a cooperative mechanism involving fermentative and respiratory microorganisms present in the consortium. Nevertheless, *S. putrefaciens* was able to reduce a higher quantity of Fe(III) and additionally exhibited the ability to keep ferrous ion in the aqueous phase.

A requirement for the implementation of anaerobic bioleaching of iron oxides is that ferrous iron occurs in aqueous phase. However, most of the Fe(III)-reducing microorganisms produce a great amount of precipitates. The relative abundance of mineral end products depends strongly on the bacterial species (Salas et al., 2010). The formation of these products is disadvantageous due to the necessity to remove them.

The influence of humics and related compounds on the stimulation of the Fe(III) oxides reduction was investigated in order to evaluate the effect of the analog AQDS. Until recently, it was considered that microorganisms should be in direct contact with insoluble Fe(III) sources to reduce them. These extracellular quinones are known to serve as electron shuttles between dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms

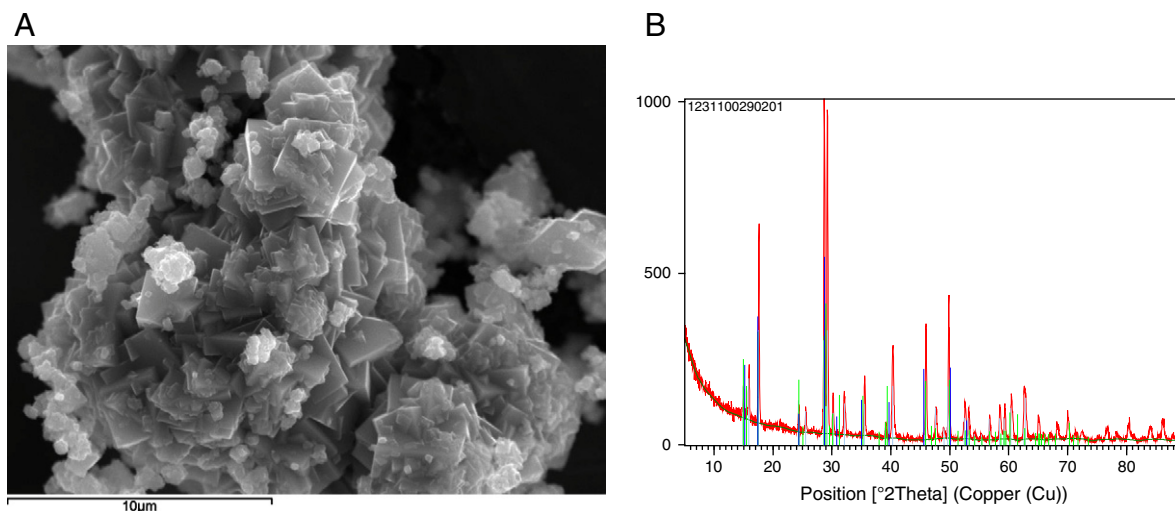


Fig. 1. Characterization of jarosites synthesized by *Sulfobolus metallicus*: (A) secondary electron FE-SEM micrograph and (B) XRD pattern.

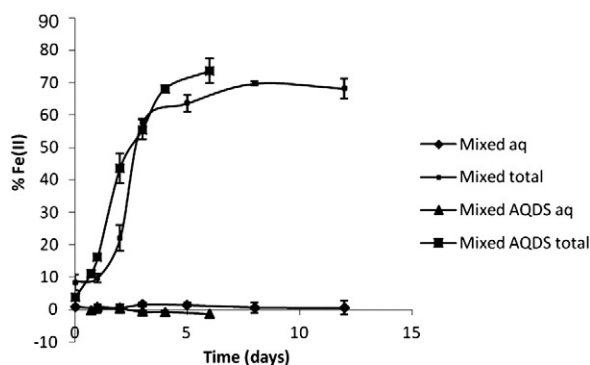


Fig. 3. Production of soluble and total Fe(II) in mixed culture. Jarosite was used at 3 g/l as the only source of iron. All Fe(II) measurements were performed in duplicate by means of ferrozine method and standard deviation ($n=2$) is shown in each data point. Error bars not visible are smaller than symbols.

and Fe(III) minerals (Lovley et al., 1998; Luu and Ramsay, 2003). To our knowledge, there are only preliminary studies about the effect of humics on crystalline oxides such as jarosites, and most previous works deal with poorly crystalline Fe(III) oxyhydroxides. Both cultures were growth in the medium with jarosites supplemented with 100 μ M AQDS. AH_2QDS was produced by microbial reduction of AQDS. The production of AH_2QDS was evidenced by the change of color of the medium from uncolored to orange. The change of color was not observed in the abiotic control in the presence of AQDS and Fe^{2+} was not produced (Fig. 3).

The addition of AQDS to the mixed culture medium resulted in Fe(II) production profiles similar to those for the bioreduction in the absence of AQDS (Fig. 2). The most important results were achieved adding AQDS to *S. putrefaciens* medium (Fig. 3). However, the addition of quinone did not improve the yield of total Fe(III) reduction and the concentration of Fe(II) in aqueous phase was the same as in its absence. Consequently, AQDS did not have a remarkable role as chelator of Fe^{2+} . In contrast, a faster Fe(II) production kinetics was observed and the time to obtain the maximum bioreduction was shorten from 30 to 12 days.

X-ray diffraction analysis of the precipitates recovered from the consortium and *Shewanella* cultures allowed the identification of their components. Both patterns were very different from the unreacted jarosite (Fig. 1B) and between them (Fig. 4).

As it was shown in Eq. (1), HCO_3^- is formed in the bacterial reduction and siderite formation has been reported in many studies (Mortimer and Coleman, 1997; Roh et al., 2006; Zachara et al., 2002). Humic acids generally complex aqueous Fe(II) weakly. Moreover, the addition of humics could alter the mineralogy and crystallinity because humic substances have a strong affinity for mineral surfaces (Larese-Casanova et al., 2010).

The precipitate produced by the prokaryotic consortium showed a complex mixture of minerals and low crystallinity (Fig. 4A). The main compound identified was siderite (FeCO_3). In the presence of AQDS in the medium, carphosiderite ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_5(\text{H}_2\text{O})$) was formed (Fig. 4B). The addition of the humic analog promoted in the formation of a hydroxy-sulfate green rust of type 2 (Berthelin et al., 2006).

The X-ray diffraction pattern of the precipitates formed by *Shewanella* was identified as siderite (FeCO_3) and magnetite (Fe_3O_4) (Fig. 4C). The addition of AQDS did not change significantly the XRD pattern (Fig. 4D). Regarding the black precipitate observed during the reduction process, such color is a characteristic of FeS produced by sulfate reducing bacteria. This compound was not detected by XRD analysis probably due to its amorphous nature. However, evidence of FeS formation was found during the analytical procedure when samples were dissolved in HCl and the characteristic H_2S odor was detected.

The formation of these end products is an additional disadvantage to bioleaching because in the case of green rust 2 and magnetite a certain amount of Fe(III) still remains unavailable to the microbial population.

The cultures and their precipitates were observed by FE-SEM (Fig. 5). *S. putrefaciens* and the bacterial consortium images showed cells onto the solid phase likely due to the low solubility of Fe(III) oxides. These microbes are able to reduce structural Fe(III) in jarosite via contact of the cell surface with the Fe(III) mineral to transfer electrons from components of the respiratory chain. *Shewanella* could release compounds that, like chelators, can lead to the solubilization of ferrous ions produced. In addition, humic substances can act as

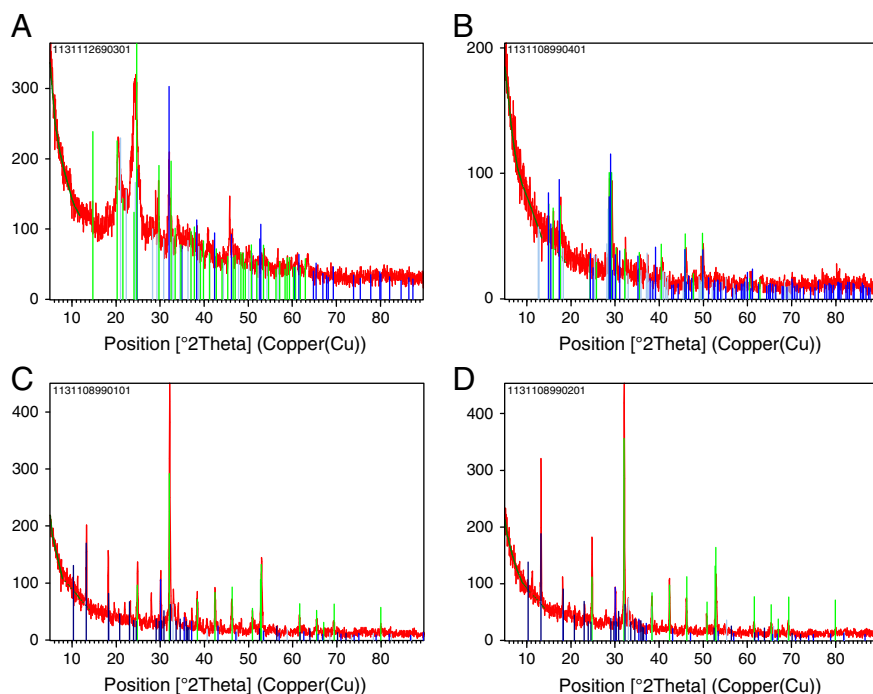


Fig. 4. XRD patterns of the precipitates formed by: (A) the bacterial consortium in the absence, (B) the bacterial consortium in the presence of AQDS, (C) *Shewanella putrefaciens* in the absence and (D) *S. putrefaciens* in the presence of AQDS.

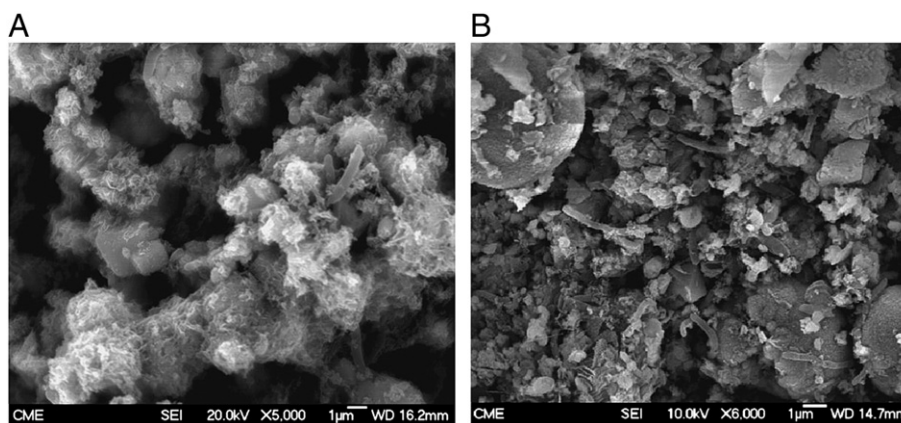


Fig. 5. FE-SEM images of jarosites after reaction with microbes: (A) mixed culture and (B) *S. putrefaciens*.

electron shuttles for the indirect reduction of Fe(III) by an indirect mechanism. AQDS is reduced by microorganisms to AH₂QDS which subsequently participates in the reduction of the oxide. In turn, AQDS can be regenerated for a new cycle. The results obtained point that both direct and indirect reduction processes require the access to surface sites on the jarosite.

4. Conclusions

To our knowledge, there are no previous works about the influence of humic substances in the bacterial reduction of jarosites and very few investigations about anaerobic bioleaching of this important iron-sulfate mineral.

The study shows that jarosite bioreduction and Fe²⁺ solubilization are greatly affected by the phylogenetical diversity of microorganisms. It is likely that mechanisms of Fe(III) reduction vary among different groups of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. Mixed culture reached the maximum reduction of 70% in a short time of one week. *S. putrefaciens* showed the ability to reduce jarosite while keeping the Fe(II) produced in solution. These results offer an economical and environmentally interesting method of bioleaching from solid ferric ores. Furthermore, the addition of AQDS to *S. putrefaciens* accelerates the process and the maximum yield of iron reduction was obtained in half time. This behavior reveals that microbial catalysis of anaerobic iron leaching has commercial potential. As Fe(II) can be obtained in concentrated dissolutions, the microbial product should require less reducing power during conversion to elemental iron in subsequent iron-production steps.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to the Spanish Ministry of Science and Technology for funding this work (projects MAT2008-01879 and MAT2011-24186).

References

Berthelin, J., Ona-Nguema, G., Stemmler, S., Quantin, C., Abdelmoula, M., Jorand, F., 2006. Bioreduction of ferric species and biogenesis of green rusts in soils. *C.R. Geosci.* 338, 447–455.

Bonneville, S., Behrends, T., Van Cappellen, P., 2009. Solubility and dissimilatory reduction kinetics of iron(III) oxyhydroxides: a linear free energy relationship. *Geochim. Cosmochim. Acta* 73 (18), 5273–5282.

Bridge, T.A.M., Johnson, D.B., 2000. Reductive dissolution of ferric iron minerals by *Acidiphilium* SJH. *Geomicrobiol. J.* 17, 193–206.

Coggon, M., Becerra, C.A., Nüsslein, K., Miller, K., Yuretich, R., Ergas, S.J., 2012. Bioavailability of jarosite for stimulating acid mine drainage attenuation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 78, 65–76.

Ergas, S.J., Harrison, J., Bloom, J., Forloney, K., Ahlfeld, D.P., Nüsslein, K., Yuretich, R.F., 2006. Chap 7. Natural Attenuation of Acid Mine Drainage by Acidophilic and Acidotolerant Fe(III)- and Sulfate-reducing Bacteria. In: Clark II, C., Lindner, A. (Eds.), *Remediation of hazardous Waste in the Subsurface: Bridging Flask and Field Studies*. American Chemical Society Symposium Series No. 940, pp. 105–107. Washington DC.

García-Balboa, C., Bedoya, I.C., González, F., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A., Ballester, A., 2010. Bio-reduction of Fe(III) ores using three pure strains of *Aeromonas hydrophila*, *Serratia fonticola* and *Clostridium celerecrescens* and a natural consortium. *Bioresour. Technol.* 101, 7864–7871.

Hallberg, K.B., Grail, B.M., du Plessis, C.A., Johnson, D.B., 2011. Reductive dissolution of ferric iron minerals: a new approach for bioprocessing nickel laterites. *Miner. Eng.* 24, 620–624.

Jones, E.J.P., Nadeau, T.L., Voytek, M.A., Landa, E.R., 2006. Role of microbial iron reduction in the dissolution of iron hydroxysulfate minerals. *J. Geophys. Res.* 111 (G1), G01012.

Kappler, A., Benz, M., Schink, B., Brune, A., 2004. Electron shuttling via humic acids in microbial iron(III) reduction in a freshwater sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 85–92.

Laresse-Casanova, P., Haderlein, S.B., Kappler, A., 2010. Biomineralization of lepidocrocite and goethite by nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacteria: effect of pH, bicarbonate, phosphate, and humic acids. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 3721–3734.

Lee, J.H., Roh, I., Kim, K.W., Hur, H.G., 2007. Organic acid-dependent iron mineral formation by a newly isolated iron-reducing bacterium, *Shewanella* sp. HN-41. *Geomicrobiol. J.* 24, 31–41.

Li, H., Feng, Y., Lu, S., Du, Z., 2005. Bio-leaching of valuable metals from marine nodules under anaerobic conditions. *Miner. Eng.* 18 (15), 1421–1422.

Li, I., Vali, H., Yang, J., Phelps, T.J., Zhang, C., 2006. Reduction of iron oxides enhanced by sulphate-reducing bacterium and biogenic H₂S. *Geomicrobiol. J.* 23, 103–117.

Liu, T., Li, X., Li, F., Zhang, W., Chen, M., Zhou, S., 2001. Reduction of iron oxides by *Klebsiella pneumoniae* L17: kinetics and surface properties. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects* 379, 143–150.

Lovley, D.R., Fraga, J.L., Blunt-Harris, E.L., Hayes, L.A., Phillips, E.J.P., Coates, J.D., 1998. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 26, 152–157.

Luu, Y-Su, Ramsay, Juliana A., 2003. Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe(III) as an energy source. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 215–225.

Mortimer, R.J.G., Coleman, M.L., 1997. Microbial influence on the oxygen isotopic composition of diagenetic siderite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 1705–1711.

Papassiopi, N., Vaxevanidou, K., Paspaliaris, I., 2010. Effectiveness of iron reducing bacteria for the removal of iron from bauxite ores. *Miner. Eng.* 23, 25–31.

Roh, Y., Gao, H.C., Vali, H., Kennedy, D.W., Yang, Z.K., Gao, W.M., Dohnalkova, A.C., Stapleton, R.D., Moon, J.W., Phelps, T.J., Fredrickson, J.K., Zhou, J.Z., 2006. Metal reduction and iron biomineralization by a psychrotolerant Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella* sp. strain PV-4. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3236–3244.

Salas, E.C., Berelson, W.M., Hammond, D.E., Kampf, A.R., Nealson, H.H., 2010. The impact of bacterial strain on the products of dissimilatory iron reduction. *Geochim. Cosmopolita Acta* 74, 574–583.

Stookey, L.L., 1970. Ferrozine — a new spectrophotometric reagent for iron-. *Anal. Chem.* 42, 779–781.

Vestola, E.A., Kuusenaho, M.K., Närhi, H.M., Tuovinen, O.H., Puhakka, J.A., Plumb, J.J., Kaksonen, A.H., 2010. Acid bioleaching of solid waste materials from copper, steel and recycling industries. *Hydrometallurgy* 103, 74–79.

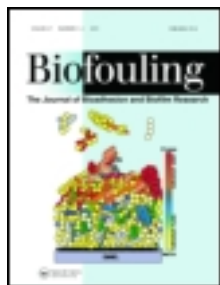
Zachara, J.M., Kukkadapu, R.K., Fredrickson, J.K., Gorby, Y.A., Smith, S.C., 2002. Biomineralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB). *Geomicrobiol. J.* 19, 179–207.

This article was downloaded by: [Laura Castro]

On: 31 March 2014, At: 08:42

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gbif20>

Characterization of exopolymeric substances (EPS) produced by *Aeromonas hydrophila* under reducing conditions

Laura Castro^a, Ruiyong Zhang^b, Jesús A. Muñoz^a, Felisa González^a, M. Luisa Blázquez^a, Wolfgang Sand^b & Antonio Ballester^a

^a Department of Material Science and Metallurgical Engineering, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

^b Biofilm Centre, Aquatic Biotechnology, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany

Published online: 27 Mar 2014.

To cite this article: Laura Castro, Ruiyong Zhang, Jesús A. Muñoz, Felisa González, M. Luisa Blázquez, Wolfgang Sand & Antonio Ballester (2014): Characterization of exopolymeric substances (EPS) produced by *Aeromonas hydrophila* under reducing conditions, *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, DOI: [10.1080/08927014.2014.892586](https://doi.org/10.1080/08927014.2014.892586)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2014.892586>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Characterization of exopolymeric substances (EPS) produced by *Aeromonas hydrophila* under reducing conditions

Laura Castro^a, Ruiyong Zhang^b, Jesús A. Muñoz^a, Felisa González^a, M. Luisa Blázquez^a, Wolfgang Sand^b and Antonio Ballester^{a*}

^aDepartment of Material Science and Metallurgical Engineering, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain; ^bBiofilm Centre, Aquatic Biotechnology, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany

(Received 15 July 2013; accepted 4 February 2014)

The aim of this work was to investigate the production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Aeromonas hydrophila* grown under anaerobic conditions. EPS composition was studied for planktonic cells, cells attached to carbon fibre supports using a soluble ferric iron source and cells grown with a solid ferric iron mineral (gossan). Conventional spectrophotometric methods, Fourier transform infrared (FTIR) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) were used to determine the main components in the biofilm extracted from the cultures. The key EPS components were proteins, indicating their importance for electron transfer reactions. Carbohydrates were observed mostly on the mineral and contained terminal mannosyl and/or terminal glucose, fucose and *N*-acetylgalactosamine residues.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*; extracellular polymeric substances; CLSM; FTIR; SEM

Introduction

Microorganisms grow in natural environments usually in the form of interfacial films bound to different substrata. Bacterial biofilms are composed of a hydrated matrix of extracellular polymeric substances (EPS) which form their immediate environment. The typical constituents of EPS are polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids (Flemming et al. 2007). These compounds provide the mechanical stability for these biofilms (Sutherland 2001), mediate their adhesion to surfaces (Lüttge et al. 2005) and form a cohesive three-dimensional polymer network interconnecting and immobilizing cells. EPS can be subdivided into bound/capsular EPS and soluble/colloidal EPS (Sheng et al. 2010). Capsular EPS are tightly bound to cells, while colloidal EPS are weakly bound to cells or easily lost into the solution. Generally, these two types of EPS can be separated by centrifugation, with those remaining in the supernatant being soluble, colloidal EPS and those forming microbial pellets being bound capsular EPS. EPS of the biofilm matrix appear to have several key properties and functions. Polymers represent a structural component of microbial cell surfaces. EPS may carry charged or hydrophobic groups resulting in an adsorptive polymer which can bind various nutrients, metals and contaminants (Harrison et al. 2007). Some EPS are involved in informative functions (Whitchurch et al. 2002), whereas others are able to condition interfaces (Zhong et al. 2007). Moreover, some polymers represent an ideal source of nutrients (Davey & O'Toole 2000) and some can be

involved in motility (Lu et al. 2005). Although speculative, some evidence shows that there is a potential role for redox-active EPS used by certain bacteria for anaerobic respiration (Neu & Lawrence 2009). Extensive research undertaken in the past few decades has focused on understanding the properties of these biopolymers. Several analytical techniques are used for studying EPS components. The use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the field of microbiology has proved to be a promising technique. FTIR spectroscopy simultaneously measures the vibrations of functional groups of different cell components in multi-component mixtures (Schmitt & Flemming 1998; Sheng et al. 2006). Furthermore, there has been the development and application of techniques allowing the observation of fully hydrated interfacial microbial cultures using confocal laser scanning microscopy (CLSM) (Neu & Lawrence 1997; Neu et al. 2001; Zippel & Neu 2011).

In anaerobic soil and sedimentary environments, microbial reductive dissolution of iron oxides coupled to oxidation of organic matter (electron donor) is thought to be an important biogeochemical process, resulting in the formation of biogenic ferrous iron (Fe(II)) species.

Gossan ores are natural minerals composed mainly of iron oxyhydroxides with residual unaltered minerals such as quartz. In addition to iron oxyhydroxides, various precious metals, such as gold and silver, and various sulphate and silicate minerals can occur in gossans (Essalhi et al. 2011). Anaerobic iron bioleaching is ubiquitous in

*Corresponding author. Email: ambape@quim.ucm

Manuscript Number: RESMIC-D-14-00143

Title: AEROMONAS HYDROPHILA PRODUCES CONDUCTIVE NANOWIRES

Article Type: Special Issue Paper

Keywords: iron reducing bacteria, conductive-AFM, AHL, biofilms, cell attachment

Corresponding Author: Mrs. Laura Castro,

Corresponding Author's Institution: Complutense University of Madrid

First Author: Laura Castro

Order of Authors: Laura Castro; Mario Vera; Jesús A Muñoz; M. Luisa Blázquez; Felisa González; Wolfgang Sand Sand; Antonio Ballester

Abstract: *Aeromonas hydrophila* is a facultative anaerobe which, under conditions of oxygen depletion, uses Fe(III) as electron acceptor. *A. hydrophila* produces pili during growth with Fe(III). Scanning electron microscopy and conductive-probe atomic force microscopy revealed the presence of filaments between cells and substrate and their conductive nature. Our results indicate that pili of *A. hydrophila* strain A might serve as biological nanowires, transferring electrons from the cell surface to the surface of Fe(III) oxides and, in addition, the possibility of playing a role in inter/intra species signalling. Quorum sensing (QS) is recognized as one of the main regulatory ways for extracellular polymeric substances (EPS) production and biofilm formation. We present evidence that nanowire formation can be regulated by addition of synthetic acyl-homoserine lactones (AHL). These conductive pili may be involved in various interactions, and their protein components might be usable in the future for biotechnological approaches in materials science.

***AEROMONAS HYDROPHILA* PRODUCES CONDUCTIVE
NANOWIRES**

Laura Castro^a, Mario Vera^b, Jesús Ángel Muñoz^a, María Luisa Blázquez^a, Felisa
González^a, Wolfgang Sand^b, Antonio Ballester^{*a}

^aDepartment of Materials Science and Metallurgical Engineering, Complutense
University of Madrid. Av. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^bBiofilm Centre, Aquatic Biotechnology, University of Duisburg-Essen, Universitätsstr.
5, 45141 Essen, Germany

***Corresponding author**

Address: Av. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

Phone: +34 91 394 4339

Email: ambape@ucm.es

Abstract

Aeromonas hydrophila is a facultative anaerobe which, under conditions of oxygen depletion, uses Fe(III) as electron acceptor. *A. hydrophila* produces pili during growth with Fe(III). Scanning electron microscopy and conductive-probe atomic force microscopy revealed the presence of filaments between cells and substrate and their conductive nature. Our results indicate that pili of *A. hydrophila* strain A might serve as biological nanowires, transferring electrons from the cell surface to the surface of Fe(III) oxides and, in addition, the possibility of playing a role in inter/intra species signalling. Quorum sensing (QS) is recognized as one of the main regulatory ways for extracellular polymeric substances (EPS) production and biofilm formation. We present evidence that nanowire formation can be regulated by addition of synthetic acyl-homoserine lactones (AHL). These conductive pili may be involved in various interactions, and their protein components might be usable in the future for biotechnological approaches in materials science.

Keywords: iron reducing bacteria, conductive-AFM, AHL, biofilms, cell attachment

1. Introduction

Microbes that can transfer electrons to extracellular acceptors, such as Fe(III) oxides, are important for organic matter degradation and nutrient cycling in soils and sediments [1, 2]. Dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms transfer electrons derived from central metabolism to a site of reduction somewhere outside the membrane. The mechanisms by which microorganisms access and reduce insoluble Fe(III)-compounds are poorly understood [3]. At first it was considered that microbial Fe(III) reduction required a direct cell contact with the oxide. However, later investigations have focused on the role of outer-membrane c-type cytochromes in electron transfer to Fe(III) [4] or on the use of “electron shuttling” compounds either produced by the cells [5] or present in their environment [6]. The possibility that metal reducing bacteria are able to use a solid conductive or a semi-conductive material for electron transfer remains quite unexplored. Nowadays findings show that some bacterial pili are electrically conductive suggesting that these “nanowires” act as electron conduits to metal acceptors during respiration [7, 8]. Recently, filamentous bacteria have been suggested to electrically mediate the coupling of oxygen reduction to the oxidation of sulphide generated from degradation of organic matter in marine sediments [9].

Bacteria have developed contact-dependent systems in order to coordinate cellular movement between members of the same species [10]. For instance, Type III secretion systems (T3SS) use a flagellum-like tube to deliver protein effectors into eukaryotic host cells. Type IV systems consist of a pilus-based system to mediate DNA or protein transfer into recipient cells. In addition, these systems can also regulate some metabolic pathways. Analyses of *Geobacter sulfurreducens* and other metal-reducing bacteria have shown that these possess another, possibly contact-dependent mechanism of communication, conductive pili[11].

Bacteria could connect themselves via nanowires and these conductive pili could play a role in inter/intra species signalling/communication [12].

Microbe/electrode interactions can possibly be applied to bioelectrochemical processes, such as microbial fuel/electrolysis cells and bioremediation. The pili of *G. sulfurreducens* might serve as biological nanowires, transferring electrons from the cell surface to the surface of Fe(III) oxides [7]. Recent studies have revealed that some bacteria perform anodic or cathodic half reactions using electrodes (mostly graphite) as electron donors or acceptors, respectively. For example, dissimilatory iron-reducing bacteria, such as *Shewanella* and *Geobacter*, oxidize organic compounds and transfer electrons to anodes, which results in current generation in microbial fuel cells. In the latter case, only electron transport through a solid conductive matrix can explain the observed high current densities and low anode potential losses [13-15].

Biofilm formation plays a key role in biological processes in both technological and natural environments [16]. Furthermore, biofilm development is a complex process that can be regulated at different levels through diverse mechanisms. Quorum sensing (QS) is a widespread phenomenon that enables microorganisms to establish cell-cell communication and to regulate the expression of genes in response to local changes in cell density [17]. In many Gram negative bacteria, the main diffusible QS signal molecules are members of the *N*-acylhomoserine lactone (AHL) family [18, 19].

Aeromonas spp. are ubiquitous bacteria found in a variety of aquatic environments worldwide, including bottled and chlorinated, subsurface, and heavily polluted waters [20]. These are facultative anaerobic chemoorganotrophs capable of anaerobic respiration and dissimilatory metal reduction. Very little is known about the mechanisms that confer metabolic versatility to *A. hydrophila* to persist in its aquatic habitats (including polluted

waters) or that facilitate ecological interactions with other prokaryotic and eukaryotic organisms. Additionally, the different roles of *Aeromonas* spp. in nutrient cycles of aquatic environments and their potential for biotechnological use in bioremediation are relatively unknown. *A. hydrophila* possesses a canonical type I-QS system. Homologous genes to the *Vibrio cholera luxI/R* have been found (named *ahyI/R*) and autoinducers of the AHL type are produced. Among them, short chain ones such as *N*-butanoyl-L-AHL (C4-AHL) and *N*-hexanoyl-L-AHL (C6-AHL) have been identified as the main ones synthesized [21]. Several phenotypes are shown to be regulated by QS in different strains of *A. hydrophila*. An *ahyI* mutant strain, unable to produce AHLs, failed to have exoprotease activity and to form mature biofilms on steel surfaces. Both phenotypes were partially reverted by the external addition of C4-AHL [22, 23]. In the virulent diarrhoeal strain SSU of *A. hydrophila*, a double mutant *ahyRI* was studied. Its protease production was substantially reduced compared with that in the wild-type (WT) strain. Additionally, the *ahyRI* mutant was unable to secrete type VI secretion system (T6SS)-associated effectors and produced a different type of surface polysaccharide compared to the wild type. Also its biofilm formation was reduced [24].

In this work, nanowires of *A. hydrophila* were studied when cells were grown under anaerobic iron-reducing conditions. These filaments were first observed by scanning electron microscopy (SEM). Atomic force microscopy (AFM) confirmed the presence of nanowires and, after topographic scanning, the electrical properties of the bacterial nanowires were investigated using conductive probe-AFM. Proteins from the loosely bounded extracellular polymeric substances (EPS) of *A. hydrophila* were isolated and were identified after mass spectrometry to characterize pili components in a preliminary experiment. In addition, cell attachment to activated carbon after addition of different AHL signalling molecules was tested.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain and culture conditions

The strain A of *Aeromonas hydrophila* used in this study was isolated from a sample collected from the edge of an open-pit lake surrounding an abandoned mine site named “Brunita” (formerly a source of Pb–Zn ores) near La Unión (Murcia, Spain). Axenic cultures were obtained by spreading 100 µl of enrichments of active Fe(III)-reducing cultures onto agar plates (20 g/l of agar) prepared in Postgate C medium supplemented with ferric citrate (60 mM in Fe³⁺). Plates were incubated at 30 ± 2 °C in an anaerobic jar (GENbox bioMérieux) for 72 h. The pure isolate was sent to the Spanish Collection of Type Cultures (CECT, University of Valencia, Valencia, Spain) for its identification. Partial 16S rRNA sequences were obtained from the CECT microbial identification service as described [25]. *A. hydrophila* strain A was deposited in the CECT (Spanish Collection of Type Cultures) under the number CECT 8424. After isolation, the cultures were grown in modified Postgate C (g/l): KH₂PO₄, 0.5; NH₄Cl, 1.0; Na₂SO₄, 4.5; CaCl₂·2H₂O, 0.04; MgSO₄·7H₂O, 0.06; sodium lactate, 6.0; yeast extract, 1.0; and sodium citrate, 0.22. pH was adjusted to 7.0 ± 0.2. The medium was supplemented with ferric citrate as electron acceptor (60 mM Fe³⁺). Aerobic sterilized media (121 °C, 30 min) were dispensed into individual glass flasks. Then, the solution was vigorously bubbled with N₂:CO₂ (80/20, v/v) to strip dissolved oxygen. The flasks were capped with butyl rubber stoppers and sealed with aluminium crimps. Batch cultures were incubated unstirred at 30 °C in darkness.

2.2. Solid substrates used in nanowires and biofilm formation

The supports used for bacterial attachment were: glass slides (Menzel-Gläser), highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) with a mosaic spread of $1.2^\circ \pm 0.2^\circ$ and a grain size of up to 1 μm (Pelco), and pyrite (FeS_2) slices. The latter ones were cut to 1-2 mm thickness from museum grade pyrite crystals by using a Logitech Model 15 with a diamond cut-off wheel (B 127, $\phi 127$, thickness 0.48, ATM LLC). Gossan mineral samples (with a 43% SiO_2 and 29% Fe as the main components), were collected in Rio Tinto (Huelva, Spain) from a sulfidization-cyanidation plant (Río Tinto Minera S.A.), and milled to a grain size lower than 40 μm .

2.3. Transmission Electron Microscopy (TEM)

A. hydrophila cells were grown with modified Postgate C (as described in 2.1) supplemented with gossan mineral from Rio Tinto as sole electron acceptor. Samples were filtered through 0.2 μm pore-size filters. Afterwards, they were successively dehydrated with acetone/water mixtures of 30, 50 and 70% acetone, respectively, and stored overnight at 4°C in 90% acetone. After critical-point drying [26], samples were resuspended in acetone and dropped onto carbon-coated copper grids allowing the solvent to evaporate. TEM analyses were performed with a JEOL model JEM-2100 instrument operated at an accelerating voltage of 200 kV.

2.4. Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM)

A. hydrophila was grown on different solid supports (glass, pyrite and HOPG) with lactate/ferric citrate medium. Supports were successively dehydrated with acetone and stored as described previously. After critical-point drying, samples were coated with graphite and gold [27]. Supports were examined with a JEOL JSM-6330 F microscope, FE-SEM, in order to observe the spatial distribution of bacteria on the solid surfaces.

2.5. Protein purification

Extracellular proteins from EPS fractions were precipitated using 13% trichloroacetic acid (TCA) [28]. The mixture was stored overnight at 4°C. Then, the solution was centrifuged for 15 min at 10000 rpm and 4°C. The supernatant was carefully removed and the protein pellet was washed once with ethanol 70% and air-dried. SDS-PAGE was prepared as described by Laemmli et al. [29]. Briefly, proteins were incubated in 1× Laemmli buffer (Tris-HCl 62 mM, pH 6.8; SDS 2% w/v; glycerin 10% v/v; 2-mercaptoethanol 5% v/v; bromophenol blue 0.02% w/v) and boiled for 10 min. SDS-PAGE was performed in 12.5% polyacrylamide gels with the Mini PROTEAN R Tetra System (BioRad) at 200 V for 45 min. Gels were stained for 10 min in a staining solution containing Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich) 10% w/v, methanol 50% v/v, glacial acetic acid 7% v/v, and H₂O 43% v/v and afterwards were destained in a solution containing methanol 25% v/v, glacial acetic acid 7.5% v/v, and H₂O 67.5% v/v. Protein bands were excised from the gels, in-gel reduced, alkylated and digested with trypsin [30] and then analyzed by mass spectroscopy (MS). MALDI-TOF MS analyses were performed in a 4800 Plus Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, Canada). For protein identification, combined searches of MS/MS spectra and PMF were performed against the non-redundant DataBase, NCBI nr, (date 20120508; 17919084 sequences; 6150218869 residues) using MASCOT 2.3 server through the Global Protein Server v3.6 (ABSciex).

2.6. Conducting-probe atomic force microscopy (CP-AFM)

Cells grown on HOPG were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution and dehydrated in a series of graded acetone and critical-point dried as described in 2.3. The sample was glued to a metallic disk with silver paint and then examined with a Bruker Dimension 3100 AFM

equipped with a Nanoscope IVa. An AFM tip Model ND-CTCR1-2 (nominal spring constant 0.35 N/m) was used for the imaging. The AFM was operated in contact mode with simultaneous tip–substrate conductivity mapping. While imaging, a slow ‘triangle-sweep’ bias voltage was applied to the tip in reference to the HOPG surface by using a low-noise battery-powered ramping circuit.

2.7. *Acyl-homoserine lactone (AHL) assays*

Activated carbon was produced from olive pits (1100 m²/g BET) and then autoclaved. Biofilm formation experiments were done in flasks containing 5 ml of modified Postgate C medium supplemented with ferric citrate, as described in 2.1. Flasks were inoculated with *A. hydrophila* cells at 8×10⁸ cells/ml and incubated at 30 °C in darkness. The different AHLs used in this study were purchased from Sigma and included: 3-oxo-octanoyl homoserine lactone (3-oxo-C8-AHL), 3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone (3-oxo-C12-AHL), and 3-oxo-tetradecanoyl homoserine lactone (3-oxo-C14-AHL). AHL stocks were dissolved at 50 mM in DMSO and stored at -20°C. They were added to the medium at a final concentration of 5 µM. Attachment and biofilm formation was visualized by SEM. Samples were taken after 1, 4, 8 and 24 h.

3. Results and discussion

A. hydrophila, as other metal reducing bacteria studied recently, produced pili during growth on Fe(III) oxide as shown in Fig. 1. According to this image, there would be contact between cells and goethite mineral from Rio Tinto during the iron reducing process, suggesting the possible existence of an alternative to direct contact mechanism of electron transfer.

3.1. Influence of the substrate nature on cell attachment and nanowire formation

Semiconductive and conductive minerals, such as pyrite, magnetite and hematite, are abundant in natural soil and sediments, and can contribute to the coupling of biogeochemical reactions [31]. In order to determine whether the nature of the substrate has a direct influence on cell attachment and *A. hydrophila* pili development, four different substrates were tested. Bacterial filament formation in the presence of soluble ferric iron as sole electron acceptor was observed by SEM on different surfaces: glass slices (Fig. 2A), pyrite coupons (Fig. 2B) and a highly ordered pyrolytic graphite (HOPG) (Figs. 2C and 2D). Obviously, the nature of the substrate seemed to be crucial for bacterial surface attachment and development of nanowires. A positive correlation was established between the number of filaments observed against the conductivity of each substrate. An increased density of substrate-attached *A. hydrophila* cells was observed on highly conductive surfaces. Cells were often intertwined (Fig. 2D), suggesting that pili could likely be also involved in other cell-to-cell mechanisms. The results shown in this experiment suggest that these bacteria are plugged into each other via nanowire contacts.

In addition, bacterial adhesion is affected by long-range forces such as hydrophilic, electrostatic or van der Waals interactions; and short-range forces such as hydrogen bonding [32]. Graphite and pyrite present natural hydrophobicity. In the presence of oxygen, the pyrite

surface is oxidized, and the oxyhydroxide formed on the surface decreases hydrophobicity which is more suitable for biofilm formation. Silica and silicate glass surfaces immersed in water are known to acquire a negative surface charge density, primarily through the dissociation of terminal silanol groups. This fact could make the glass surface more approachable for the planktonic bacteria because of hydrophilic interaction; however, as bacterial surfaces are normally negatively charged at neutral pH, glass surface would be less attractive to bacteria because of electrostatic forces. Despite that the isoelectric point of HOPG is below pH 3, there is a random distribution of positively charged spots due to the hydronium ion adsorption on HOPG surface [33], likely facilitating the cell adhesion.

3.2. Conductivity of the nanowires

Samples of cells with the extracellular nanowires from anaerobic cultures were grown on surfaces of HOPG and examined by AFM in order to assess their ability to conduct an electrical current. The topographic image of the graphite surface with cells and their filaments is shown in Fig. 3A. In parallel, the conductive image is also shown (Fig. 3B). The current showed contrast in different regions. Among them, the light pink areas correspond to HOPG substrate. Cells and filaments also exhibited a current response as conductive material.

Peak force tapping mode AFM revealed a high number of bacterial nanowires, extending well beyond a cells length (Fig. 4A). The dimensions of isolated nanowire filaments placed on the graphite surface were measured. Their width ranged from 50 to 150 nm, while their apparent height was ~10 nm above the graphite surface (Fig. 4B). After topographic scanning, the conductive properties of the filaments were studied. The current response is measured, as the voltage across the nanowire is swept, using the HOPG support as the bottom electrode and the tip as the top electrode [34]. An I/V measurement was obtained by placing the AFM tip and

sweeping the voltage from -10 to 10 V. The resulting I/V curve (Fig. 4C) demonstrates a conductive nonlinear response to the applied voltage which increased at a higher rate in the higher bias regime, displaying various irregular, but repeatable features that most likely were attributed to small fluctuations in conductance. These fluctuations could provide information about the molecular density of states of the sample. However, the lack of a robust contact between the sample and the tip may interfere with the information obtained for the I/V curves. The conductance measurements contain peaks indicating discrete energy levels with an increase density of states. Since the graphite substrate did not show these peaks, these features were attributable to the nanowires themselves.

The mechanism for extracellular electron transfer via electrically conductive nanowires is controversial. There are three primary modes for electron flow in materials: tunnelling, hopping and delocalization [35]. In both tunnelling and hopping, electrons are associated with discrete electron carriers and can traverse one or more sites to migrate over large distances. The available evidence suggests that pili produced by *A. hydrophila* have metal-like conductivity. Metallic conductivity is substantially different from hopping or tunnelling. Instead of electrons being localized in individual molecules, electrons are delocalized along a chain of molecules and electrons are free to move throughout the material [36]. In this case, the conductivity could be due to overlapping π - π of aromatic amino acids.

In microbial fuel cells, bacteria carry out a respiration process reducing the terminal electron acceptor (e.g. Fe(III)). Since most electrodes are solid conductors that can neither be solubilised nor reduced (only acting as a conductor), bacteria can only transfer electrons. The genome sequence of *A. hydrophila* ATCC 7966 encodes several genes probably involved in the formation of surface structures such as pili or fimbriae and adhesins, which may be involved in cell attachment. In addition to the characterized type IV *Aeromonas* pilus, at least

260 5 gene clusters encoding potential novel pili are encoded [20]. Until now attempts to purify
261 the protein moieties of these conductive pili from *Aeromonas* strain A have been
262 unsuccessful. In a preliminary experiment, we isolated the proteins from EPS fractions of
263 *Aeromonas* A. No pilin-like protein was identified after mass spectrometry sequencing of the
264 major protein bands from 12% SDS-PAGE gels (Table 1).

265 Most type IV secretion systems comprise three functional substructures: cell surface adhesins
266 and/or pili that mediate cell-cell contact; a secretion channel that conducts substrate through
267 the donor cell envelope; and a Type IV coupling protein, which acts as a substrate receptor at
268 the entrance of the secretion channel [10].

269 In general, it has been difficult to identify specific receptors for conjugative pili. The exposed
270 position of the outer membrane protein, OmpA, in the cell wall could reflect its function as
271 receptor. It is known that strains lacking OmpA show a drastic decrease in mating efficiency
272 via pili [37, 38].

273 The presence of elongation factor Tu (EF-Tu) on the surface of microorganisms has been well
274 documented. It was usually reported as extracellular proteins of pathogens binding to
275 plasminogen [39, 40]. In *M. pneumoniae*, EF-Tu mediates binding to the extracellular matrix
276 component fibronectin through its carboxyl region [41]. Surface-associated EF-Tu proteins
277 from other microorganisms, including *Lactobacillus johnsonii*, *Listeria monocytogenes*, and
278 *Pseudomonas aeruginosa*, were reported to bind mucin, fibrinogen, plasminogen, and factor
279 H [42]. *L. johnsonii* La1 cell wall extract led to the recognition of EF-Tu as an adhesin-like
280 factor [40].

281 The function of the antioxidant is the inhibition of the reactions brought about by oxygen or
282 peroxides. Usually the antioxidant is effective because it can be more easily oxidized than the

substance protected [43]. Consequently, this protein could be involved in the effective extracellular electron transfer functions, such as current production and Fe(III) oxide reduction.

Despite that pilin-like proteins were not identified, it was already reported that the nanowires of *Geobacter sulfurreducens* are type IV pili [7, 44]. Specific aromatic amino acids in the carboxyl terminus of the PilA sequence of *G. sulfurreducens* appear to confer conductivity [45].

3.3. Effect of AHL addition on cell attachment, biofilm formation and nanowire formation

Cell attachment by *A. hydrophila* on activated carbon surfaces in the presence of externally added oxo-AHLs (C8, C12 and C14) was analyzed by SEM. The surface was visualized after 1, 4, and 8 h of incubation with non-treated or treated cells. Substantial differences were observed especially in the initial stages of the biofilm development (Fig. 5). After addition of 3-oxo-C8-AHL (Fig. 5B), no evident changes were observed compared to the control experiment (Fig. 5A). When the microorganisms were incubated in the presence of 3-oxo-C12-AHL, the efficiency of the biofilm formation decreased (Fig. 5C). Attached cells found on the activated carbon did not show evidence of nanowire formation. It is already known that the 3-oxo-C12-AHL and its derived tetramic acid display bactericidal activities and could also alter the expression of different genes [46]. Interestingly, when the 3-oxo-C14-AHL molecule was added, a strong enhancement of the cell attachment as well as nanowire production, as compared to the control or the cultures treated with 3-oxo-C8- and 3-oxo-C12-AHL, was observed (Fig. 5D). In the presence of the 3-oxo-C14-AHL, bacteria developed a multilayered cell aggregation phenotype with nanowires interconnecting cells after 24 h (Fig. 6).

Sequenced strains of *Aeromonas* such as *A. hydrophila* and *A. salmonicida* possess homologues to the canonical LuxI/R system, the QS regulatory protein in *A. hydrophila* [21, 47]. It is known that some strains of *Aeromonas* produce short-chain AHLs [21]. However their presence was not detected when *A. hydrophila* was cultivated in nutrient-limited microcosms. In these experiments, the *ahyI* mutant showed no growth disadvantages as compared to the wild type. Consequently, AHLs are presumably not signal molecules which bacteria will employ under all environmental conditions. It has been suggested that AHL signalling in *A. hydrophila* could be more important in energy rich environments than in oligotrophic ones [48]. Although the pattern of different AHLs produced by *Aeromonas* strain A under iron reducing conditions is still unknown and will require further work, a response of strain A to the external addition of long chain AHLs was observed in our experiments. The sensing of long chain AHLs has already been reported for *A. hydrophila*, where the addition of AHLs with acyl chains of C₁₀, C₁₂ and C₁₄ antagonized exoprotease secretion, while 3-oxo-C₁₂-AHL and 3-oxo-C₁₄-AHL almost totally inhibited its production [23]. This finding suggests that some long chain AHL molecules probably secreted by other bacterial species can be recognized, indicating that cross-communication could take place between members of different communities as described for mixed biofilms of other Gram (-) bacteria [49].

Since the adherence to the anode surface and the subsequent development of these conductive biofilms can enhance the production of an electrical current in bacterial fuel cells, our results may lead to new ways to design or improve them. Besides, while increasing the surface area of the anode, an increase of cells and the biofilm should contribute to an enhanced electron flow to a given surface.

4. Conclusions

Our study provides evidence that nanowires produced by *A. hydrophila* are conductive. This may provide an opportunity to extend bacterial electron transfer capabilities well beyond the outer surface of the cells, which might be especially important in soils, in which Fe(III) oxides exist as heterogeneously dispersed coatings on clays and other particulate matter. *Aeromonas* nanowires are often intertwined, raising also the possibility of cell-to-cell electron transfer. We also provide evidence that AHL-mediated QS plays a crucial role in the formation of these wires. Further studies are needed to elucidate the AHL-mediated nanowire induction mechanisms as well as to identify their protein components, which could be promising targets for the improvement of nano-engineering and biotechnology. The knowledge of electron transport systems of dissimilatory metal-reducing bacteria could lead to novel advances in nanoelectronic applications and renewable energy recovery by microbial fuel cells.

341 **5. Acknowledgments**

342 The authors acknowledge Jordi Díaz from the Scientific and Technological Centres of the
343 University of Barcelona and Juan Luis Bardonado from the Electronic Microscopy Centre of
344 UCM for their technical assistance. We also thank the Spanish Ministry of Science and
345 Technology for funding this work (projects MAT2008-01879 and MAT2011-24186).

346

6. References

- [1] Lovley DR, Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction, *Microbiol Rev* 55 (1991) 259-287.
- [2] Wang X-J, Yang J, Chen X-P, Sun G-X, Zhu Y-G, Phylogenetic diversity of dissimilatory ferric iron reducers in paddy soil of Hunan, South China, *J Soils Sedim* 9 (2009) 568-577.
- [3] Luu YS, Ramsay JA, Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe(III) as an energy source, *World J Microb Biot* 19 (2003) 215-225.
- [4] Richardson DJ, Butt JN, Fredrickson JK, Zachara JM, Shi L, Edwards MJ, White G, Baiden N, Gates AJ, Marritt SJ, Clarke TA, The 'porin–cytochrome' model for microbe-to-mineral electron transfer, *Mol Microbiology*, 85 (2012) 201-212.
- [5] A. Stintzi, C. Barnes, J. Xu, K.N. Raymond, Microbial iron transport via a siderophore shuttle: A membrane ion transport paradigm, *P Natl Acad Sci* 97 (2000) 10691-10696.
- [6] Castro L, García-Balboa C, González F, Ballester A, Blázquez ML, Muñoz JA, Effectiveness of anaerobic iron bio-reduction of jarosite and the influence of humic substances, *Hydrometallurgy* 131–132 (2013) 29-33.
- [7] Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, Lovley DR, Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature* 435 (2005) 1098-1101.
- [8] Gorby YA, Yanina S, McLean JS, Rosso KM, Moyles D, Dohnalkova A, Beveridge TJ, Chang IS, Kim BH, Kim KS, Culley DE, Reed SB, Romine MF, Saffarini DA, Hill EA, Shi L, Elias DA, Kennedy DW, Pinchuk G, Watanabe K, Ishii SI, Logan B, Nealson KH, Fredrickson JK, Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms, *P Natl Acad Sci* 103 (2006) 11358-11363.
- [9] Pfeffer C, Larsen S, Song J, Dong M, Besenbacher F, Meyer R.L, Kjeldsen K.U, Schreiber L, Gorby YA, El-Naggar MY, Leung KM, Schramm A, Risgaard-Petersen N,

- 371 Nielsen LP, Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances, *Nature* 491
372 (2012) 218-221.
- 373 [10] Hayes CS, Aoki SK, Low DA, Bacterial contact-dependent delivery systems, *Annu Rev*
374 *Genet* 44 (2010) 71-90.
- 375 [11] Summers ZM, Fogarty HE, Leang C, Franks AE, Malvankar NS, Lovley DR, Direct
376 Exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic
377 bacteria, *Science*, 330 (2010) 1413-1415.
- 378 [12] Reguera G, When microbial conversations get physical, *Trends Microbiol*, 19 (2011)
379 105-113.
- 380 [13] Reguera G, Nevin KP, Nicoll JS, Covalla SF, Woodard TL, Lovley DR, Biofilm and
381 nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells, *Appl*
382 *Environ Microbiol* 72 (2006) 7345-7348.
- 383 [14] Kim HJ, Park HS, Hyun MS, Chang IS, Kim M, Kim BH, A mediator-less microbial fuel
384 cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*, *Enzyme Microb Tech* 30
385 (2002) 145-152.
- 386 [15] Torres CI, Marcus AK, Lee H-S, Parameswaran P, Krajmalnik-Brown R, Rittmann BE,
387 A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria, *FEMS*
388 *Microbiol Rev* 34 (2010) 3-17.
- 389 [16] Gehrke T, Telegdi J, Thierry D, Sand W, Importance of extracellular polymeric
390 substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching, *Appl Environ Microbiol* 64 (1998)
391 2743-2747.
- 392 [17] Waters CM, Bassler BL, Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annu*
393 *Rev Cell Dev Biol* 21 (2005) 319-346.
- 394 [18] Winson MK, Camara M, Latifi A, Foglino M, Chhabra SR, Daykin M, Bally M, Chapon
395 V, Salmond GP, Bycroft BW, Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules

- 396 regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas*
397 *aeruginosa*, *P Natl Acad Sci* 92 (1995) 9427-9431.
- 398 [19] Boyer M, Wisniewski-Dyé F, Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of
399 quorum, *FEMS Microbiol Ecol*, 70 (2009) 1-19.
- 400 [20] Seshadri R, Joseph SW, Chopra AK, Sha J, Shaw J, Graf J, Haft D, Wu M, Ren Q,
401 Rosovitz MJ, Madupu R, Tallon L, Kim M, Jin S, Vuong H, Stine OC, Ali A, Horneman AJ,
402 Heidelberg JF, Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades,
403 *J Bacteriol* 188 (2006) 8272-8282.
- 404 [21] Swift S, Karlyshev AV, Fish L, Durant EL, Winson MK, Chhabra SR, Williams P,
405 Macintyre S, Stewart GS, Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas*
406 *salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-
407 acylhomoserine lactone signal molecules, *J Bacteriol* 179 (1997) 5271-5281.
- 408 [22] Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevil CW, Dodd CE, Williams P, The regulation of
409 biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*, *Environ Microbiol*, 4
410 (2002) 18-28.
- 411 [23] Swift S, Lynch MJ, Fish L, Kirke DF, Tomas JM, Stewart GS, Williams P, Quorum
412 sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas*
413 *hydrophila*, *Infect Immun* 67 (1999) 5192-5199.
- 414 [24] Khajanchi BK, Sha J, Kozlova EV, Erova TE, Suarez G, Sierra JC, Popov VL,
415 Horneman AJ, Chopra AK, N-Acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control
416 the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in
417 a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*, *Microbiology+* 155 (2009) 3518-3531.
- 418 [25] D. Arahal, E. Sanchez, M. Macian, E. Garay, Value of recN sequences for species
419 identification and as a phylogenetic marker within the family "Leuconostocaceae", *Int*
420 *Microbiol*, 11 (2008) 33-39.

- 421 [26] Smith M.E., Finke E.H., Critical point drying of soft biological material for the scanning
422 electron microscope, *Invest Ophth Vis Sci* 11 (1972) 127-132.
- 423 [27] Newbury DE, Joy DC, Echlin P, Fiori CE, Goldstein JI, *Advanced Scanning Electron*
424 *Microscopy and X-Ray Microanalysis*, in, Plenum Press, 1986, pp. 454.
- 425 [28] Sambrook J, Maniatis T., Fritsch E.F., *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd
426 edition), 1989.
- 427 [29] Laemmli UK, cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
428 Bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- 429 [30] Sechi S, Chait BT, Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide
430 mapping and protein identification, *Anal Chem* 70 (1998) 5150-5158.
- 431 [31] Kato S, Hashimoto K, Watanabe K, Microbial interspecies electron transfer via electric
432 currents through conductive minerals, *P Natl Acad Sci* 109 (2012) 10042-10046.
- 433 [32] Guo K., Freguia S., Dennis P.G., Chen X., Donose B.C., Keller J., Gooding J.J., Rabaey
434 K., Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community
435 composition, and current generation in bioelectrochemical systems, *Environ Sci Technol* 47
436 (2013) 7563-7570.
- 437 [33] Koestner R, Roiter Y, Kozhinova I, Minko S, Effect of local charge distribution on
438 graphite surface on nafion polymer adsorption as visualized at the molecular level, *J Phys*
439 *Chem C*, 115 (2011) 16019-16026.
- 440 [34] El-Naggar M.Y., Gorby Y.A., Xia W., Nealson K.H., The molecular density of states in
441 bacterial nanowires, *Biophys J* 95 (2008) L10-L12.
- 442 [35] Petty MC, *Molecular Electronics: From Principles to Practice*, Wiley, 2007.
- 443 [36] Edwards PP, Gray H.B., Lodge M.T.J., Williams R.J.P., *Electron Transfer and Electronic*
444 *Conduction through an Intervening Medium*, *Angew Chem Int Edit* 47 (2008) 6758-6765.
- 445 [37] Seltmann G, Holst O, *The Bacterial Cell Wall*, Springer, 2002.

- 446 [38] Anthony KG, Sherburne C, Sherburne R., Frost LS, The role of the pilus in recipient cell
447 recognition during bacterial conjugation mediated by F-like plasmids, *Mol Microbiol* 13
448 (1994) 939-953.
- 449 [39] Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, Mendoza-Hernandez G, Comini M, Spallek R, Singh
450 M, Espitia C, Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human
451 pathogen *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteomics* 7 (2007) 3332-3341.
- 452 [40] Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Corthésy-Theulaz IE,
453 Cell Surface-Associated Elongation Factor Tu Mediates the Attachment of *Lactobacillus*
454 *johnsonii* NCC533 (La1) to Human Intestinal Cells and Mucins, *Infect Immun* 72 (2004)
455 2160-2169.
- 456 [41] Balasubramanian S, Kannan TR, Baseman JB, The Surface-Exposed Carboxyl Region of
457 *Mycoplasma pneumoniae* Elongation Factor Tu Interacts with Fibronectin, *Infect Immun* 76
458 (2008) 3116-3123.
- 459 [42] Balasubramanian S, Kannan TR, Hart PJ, Baseman JB, Amino Acid Changes in
460 Elongation Factor Tu of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* Influence
461 Fibronectin Binding, *Infect Immun* 77 (2009) 3533-3541.
- 462 [43] Zhang YL, Ong CT, Leung KY, Molecular analysis of genetic differences between
463 virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish,
464 *Microbiology+* 146 (2000) 999-1009.
- 465 [44] N.S. Malvankar, D.R. Lovley, Microbial nanowires for bioenergy applications, *Current*
466 *Opin Biotechnol* 27 (2014) 88-95.
- 467 [45] Vargas M, Malvankar N.S., Tremblay P.-L., Leang C., Smith J.A., Patel P, Synoeyenbos-
468 West O, Nevin KP, Lovley DR, Aromatic amino acids required for pili conductivity and long-
469 range extracellular electron transport in *Geobacter sulfurreducens*, *mBio*, 4 (2013).

470 [46] Schertzer JW, Boulette ML, Whiteley M More than a signal: non-signaling properties of
471 quorum sensing molecules, Trends Microbiol 17 (2009) 189-195.

472 [47] Garde C, Bjarnsholt T, Givskov M, Jakobsen TH, Hentzer M, Claussen A, Sneppen K,
473 Ferkinghoff-Borg J, Sams T, Quorum sensing regulation in *Aeromonas hydrophila*, J Mol
474 Biol 396 (2010) 849-857.

475 [48] Styp von Rekowski K, Hempel M, Philipp B, Quorum sensing by N-acylhomoserine
476 lactones is not required for *Aeromonas hydrophila* during growth with organic particles in
477 lake water microcosms, Arch Microbiol, 189 (2008) 475-482.

478 [49] Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Wu H, Høiby N, Givskov M,
479 Molin S, Eberl L, N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between
480 *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms, Microbiology+ 147
481 (2001) 3249-3262.

482

483

484

Figure captions

Figure 1. Transmission electron micrographs of cells grown with ferric oxides (gossan from Río Tinto, Spain) as sole electron acceptor.

Figure 2. *A. hydrophila* nanowire production as a function of the growth supporting substrate. Scanning electron micrographs of cells grown with soluble Fe(III) citrate on: (A) glass slide, (B) pyrite, (C) highly ordered pyrolytic graphite and (D) detail of nanowires connecting cells from panel C.

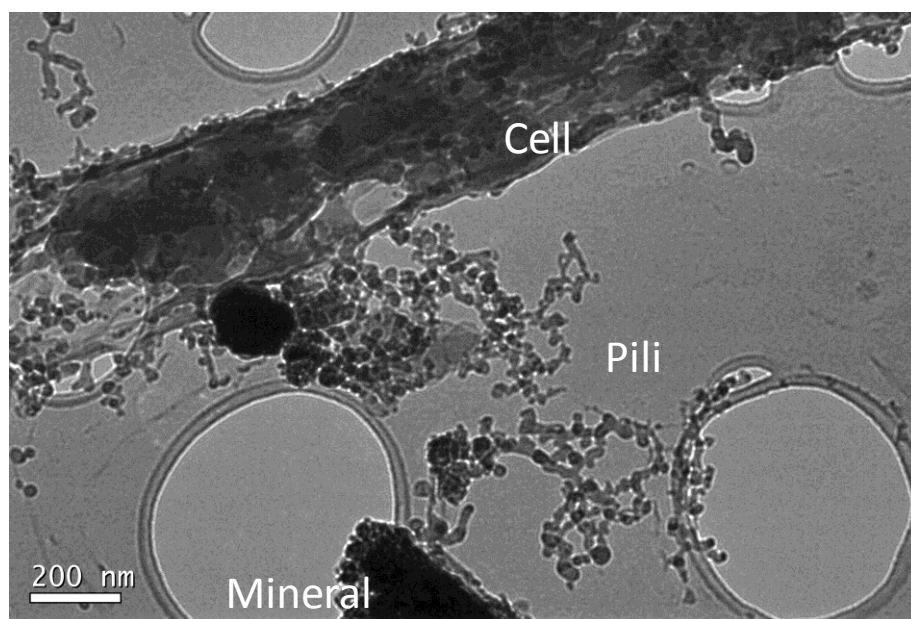
Figure 3. (A) AFM image of the topography of cells of *A. hydrophila* and their filaments on HOPG. (B) CP-AFM current image of the same field shown in panel A, with a voltage applied between the tip and sample.

Figure 4. (A) Peak force tapping mode image of *A. hydrophila* culture with a high density of bacterial nanowires on HOPG surface. (B) Height profile through the cross section of a bacterial filament. (C) The graph shows I/V plot obtained with the AFM tip placed on one of the nanowires.

Figure 5. Effect of the addition of AHLs on *A. hydrophila* biofilm formation. SEM images of bacterial attachment and biofilm formation on activated carbon after 1, 4 and 8 h. Row A shows a control experiment without addition of AHL, while rows B-D show samples after incubation with 3-oxo-C8-AHL (B), 3-oxo-C12-AHL (C), and 3-oxo-C14-AHL (D).

Figure 6. SEM image of *A. hydrophila* biofilms grown on activated carbon after 24 h: (a) non-treated culture and (b) culture in presence of 3-oxo-C14-AHL.

506 **Figure 1.**



507

508

509 **Figure 2.**

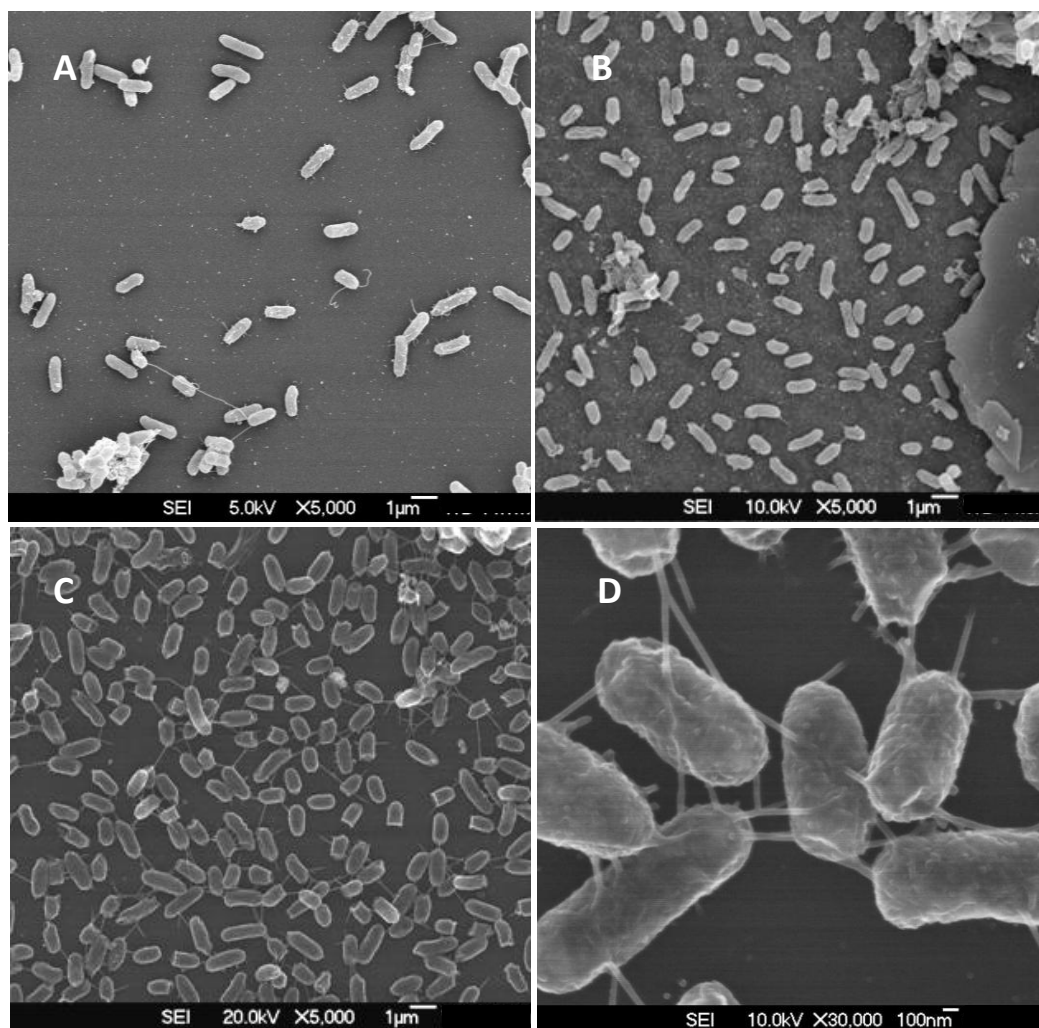
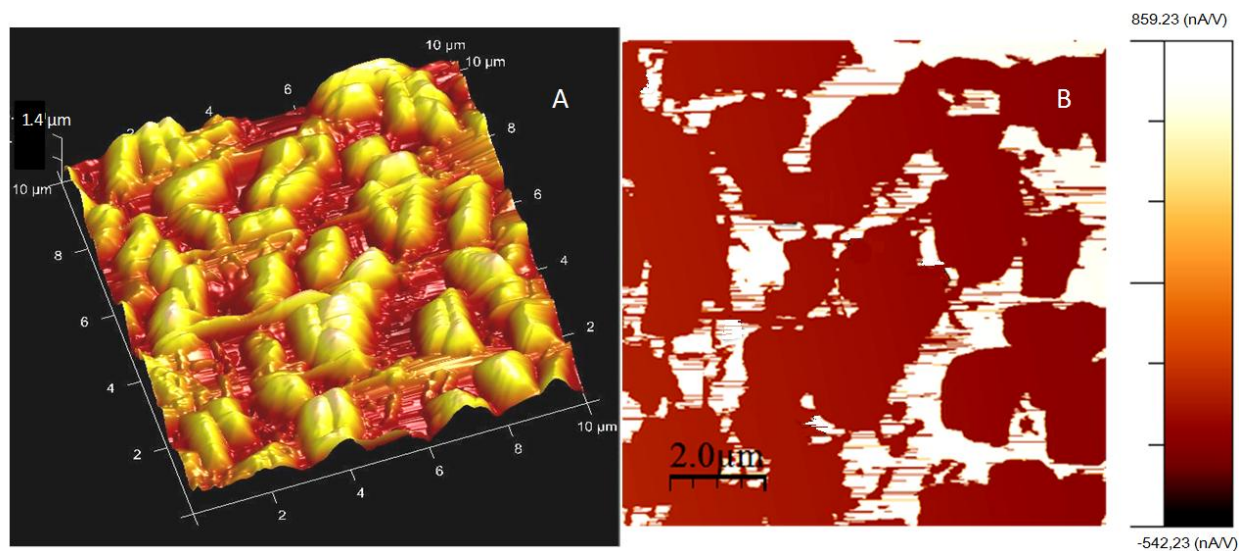
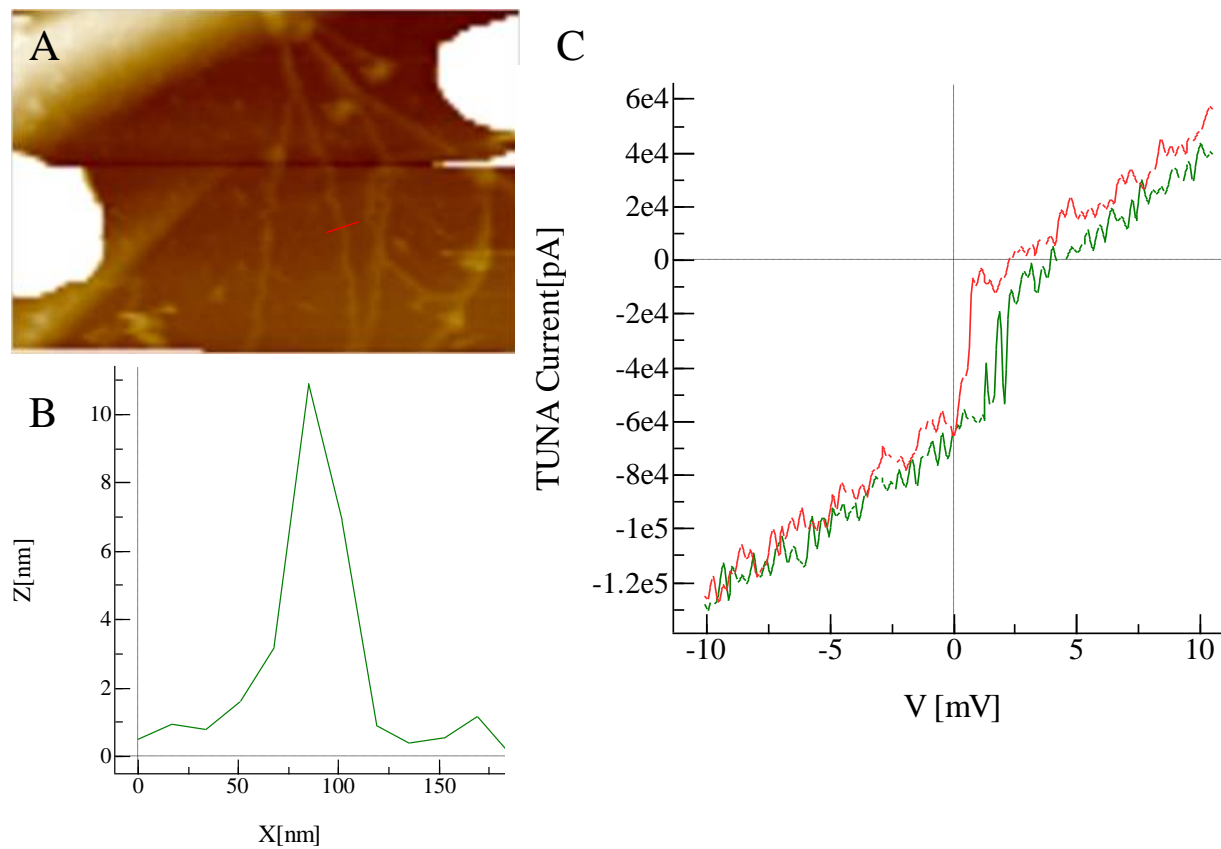


Figure 3.



514

515 **Figure 4.**

516

517

518 **Figure 5.**

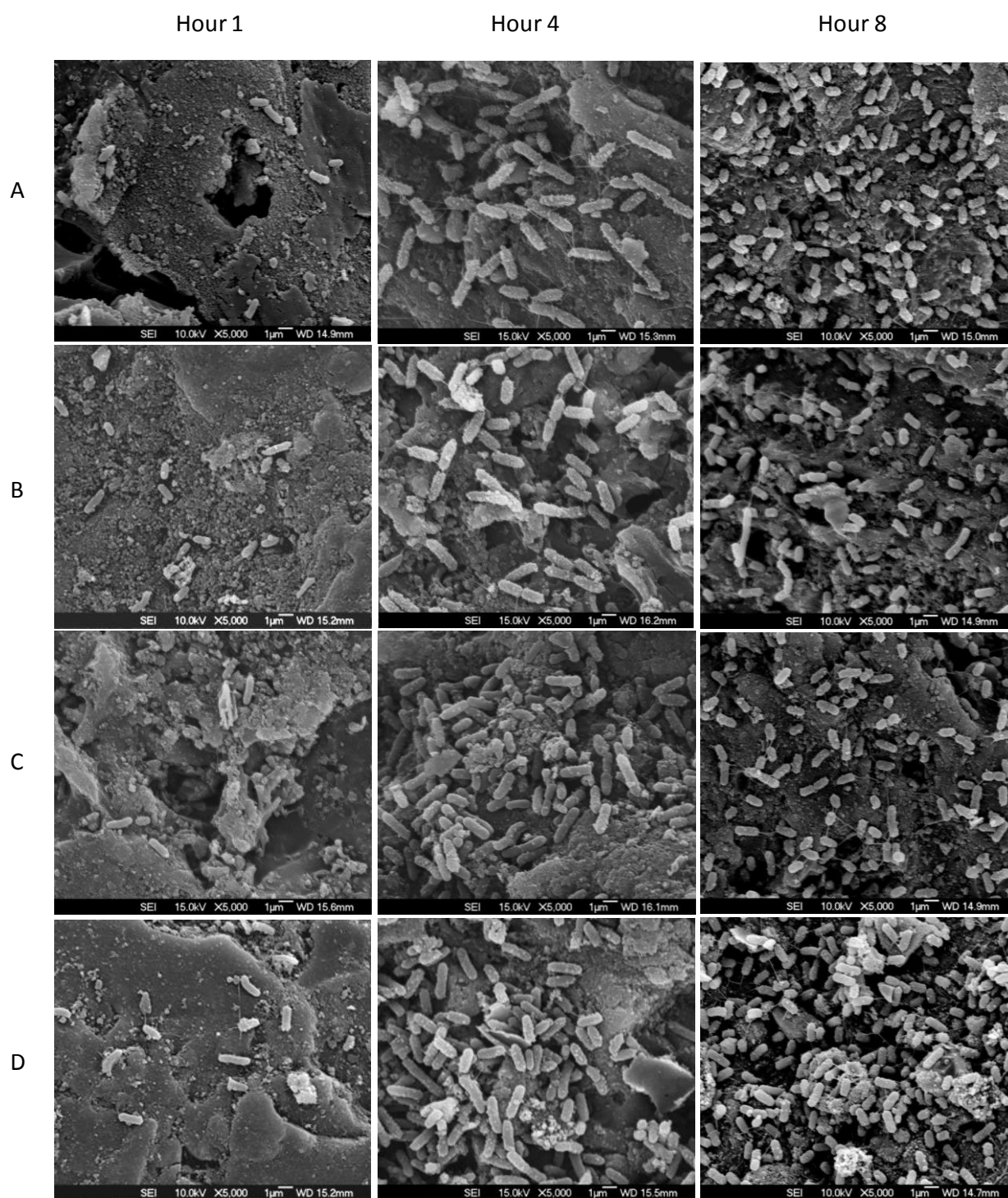
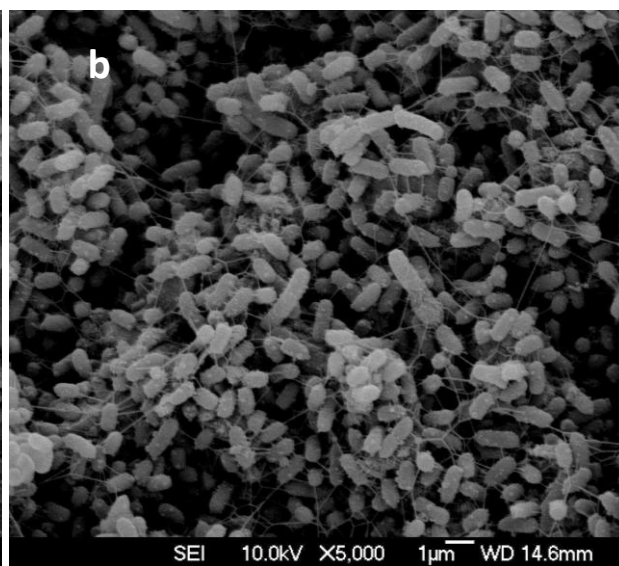
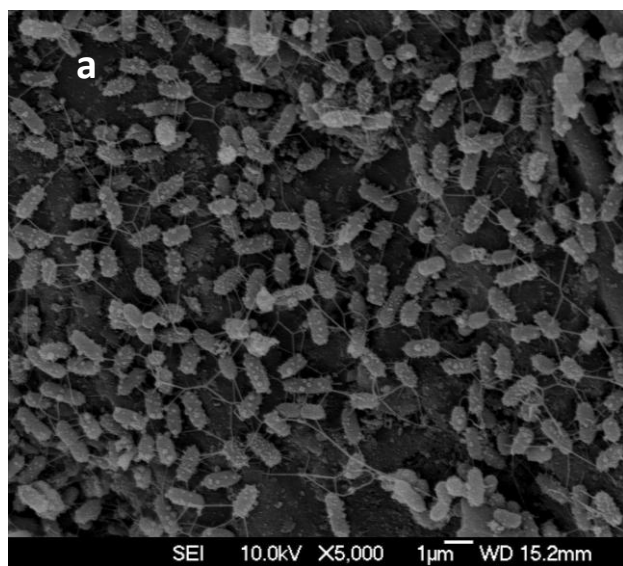


Figure 6.



523

524

Tables:**Table 1.** Extracellular proteins in loosely bounded EPS.

Accession number	Mass (kDa)	Description	Organism
gi_117617738	43.5	elongation factor Tu	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
gi_117619246	36.3	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
gi_117617738	43.5	elongation factor Tu	
gi_117621197	40.7	phosphoglycerate kinase	
gi_117620869	35.4	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
gi_117619723	39.1	fructose-bisphosphate aldolase	
gi_117620869	35.4	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
gi_117618219	35.1	major outer membrane protein OmpAII	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
gi_117618174	24.6	50S ribosomal protein L1	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
gi_117618638	23.5	30S ribosomal protein S4	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
gi_53759099	22.1	antioxidant	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
gi_117619168	20.4	50S ribosomal protein L5	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966

Dear Nicolas Guilliani:

Our submitted manuscript entitled “*Aeromonas hydrophila* produces conductive nanowires” provides evidences about the nanowires produced by *A. hydrophila* and their electrical properties. In addition to serving as a conduit for electron transfer to Fe(III) oxides, these pili could conceivably be involved in other electron transfer reactions. Our study also reveals that the addition of some “quorum sensing” autoinducers such N-acyl homoserine lactones enhance the formation of these wires. The knowledge of electron transfer systems of dissimilatory metal-reducing bacteria could lead to novel advances in nanoelectronic applications and renewable energy recovery in microbial fuel cells. We strongly believe these findings will be of interest to the readers of your journal.

We declare that this manuscript is original, has not been published before and is not currently being considered for publication elsewhere. The manuscript has been read and approved by all authors.

We hope you will find our manuscript suitable for publication and look forward to hearing from you.

Sincerely,

Prof. Antonio Ballester

Department of Materials Science and Metallurgical Engineering, Faculty of Chemistry

Complutense University of Madrid

28040 Madrid, Spain